

(12) NACH DEM VERTRÄG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG



(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro

(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
3. Januar 2002 (03.01.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
**WO 02/00599 A1**

(51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: **C07C 211/62**,  
211/63, 211/64, C07F 9/54, C11D 3/00, C12N 15/10

Ralph [DE/DE]; Bismarckstrasse 19, 41542 Dormagen  
(DE). **OELMÜLLER, Uwe** [DE/DE]; Millrather Weg 46,  
40699 Erkrath (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/05888

(74) Anwälte: **ZIMMERMANN, Gerd** usw.; Zimmermann &  
Partner, Postfach 33 09 20, 80069 München (DE).

(22) Internationales Anmeldedatum:  
22. Mai 2001 (22.05.2001)

(81) Bestimmungsstaaten (*national*): AU, CA, JP, US.

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): europäisches Patent (AT,  
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,  
NL, PT, SE, TR).

(30) Angaben zur Priorität:  
100 31 236.5 27. Juni 2000 (27.06.2000) DE

**Veröffentlicht:**  
— mit internationalem Recherchenbericht  
— vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden  
Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen  
eintreffen

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): **QIAGEN GMBH** [DE/DE]; Max-Volmer-Strasse 4,  
40724 Hilden (DE).

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen  
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on  
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe  
der PCT-Gazette verwiesen.

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): **HOLLÄNDER, Vera** [DE/DE]; Pappelweg 44, 59423 Unna (DE). **WYRICH,**



(54) Title: NOVEL COMPOSITIONS FOR ISOLATING AND/OR STABILISING NUCLEIC ACIDS IN BIOLOGICAL MATERIAL

(54) Bezeichnung: NEUE KOMPOSITIONEN FÜR DIE ISOLIERUNG UND/ODER STABILISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN IN BIOLOGISCHEN MATERIALIEN

(57) **Abstract:** The invention relates to novel compositions for isolating and/or stabilising nucleic acids in material of a biological origin. Said compositions comprise a cationic compound of general formula  $Y^+R_1R_2R_3R_4 X'$  as an essential constituent; wherein Y can represent nitrogen or phosphorus; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sup>3</sup> and R<sub>4</sub> can independently represent an unbranched or branched C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub> alkyl radical and/or a C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub> aryl radical and a C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub> aralkyl radical; and X' can represent an anion pertaining to an inorganic or organic, monobasic or polybasic acid.

**WO 02/00599 A1**

(57) **Zusammenfassung:** Die vorliegende Erfindung betrifft neue Kompositionen zur Isolierung und/oder Stabilisierung von Nukleinsäuren in Materialien biologischer Herkunft. Die Kompositionen umfassen als einen wesentlichen Bestandteil eine kationische Verbindung der allgemeinen Formel  $Y^+R_1R_2R_3R_4 X'$ ; worin Y Stickstoff oder Phosphor; R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sup>3</sup> und R<sub>4</sub> unabhängig voneinander einen unverzweigten oder verzweigten C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-Alkylrest und/oder einen C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-Arylrest sowie einen C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>-Aralkylrest und X' ein Anion einer anorganischen oder organischen, ein- oder mehrbasischen Säure bedeuten können.

1

Neue Kompositionen für die Isolierung und/oder Stabilisierung von Nukleinsäuren in biologischen Materialien.

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Kompositionen zur Isolierung und/oder Stabilisierung von Nukleinsäuren in Materialien biologischer Herkunft. Die Komposition umfassen als einen wesentlichen Bestandteil eine kationische Verbindung der allgemeinen Formel



worin

Y Stickstoff oder Phosphor

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> unabhängig voneinander einen unverzweigten oder verzweigten C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-Alkylrest und/oder einen C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-Arylrest sowie einen C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>-Aralkylrest und

X<sup>-</sup> ein Anion einer anorganischen oder organischen, ein- oder mehrbasischen Säure

bedeuten können

und mindestens einen Protonendonator als Additiv.

Bevorzugt sind Kompositionen, in denen die kationische Verbindungen aus einem Ammoniumsalz besteht, in dem R<sub>1</sub> einen höheren Alkylrest - vorzugsweise mit 12, 14 oder 16 Kohlenstoffatomen und R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> jeweils eine Methylgruppe bedeutet.

Bevorzugt sind weiterhin Kompositionen, in denen R<sub>1</sub> eine Aralkylgruppe - vorzugsweise eine Benzylgruppe -, R<sub>2</sub> einen höheren Alkylrest - vorzugsweise mit 12, 14 oder 16 Kohlenstoffatomen - und R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> eine Methylgruppe bedeutet.

Als Anionen werden Bromid, Chlorid, Phosphat, Sulfat, Formiat, Acetat, Propionat, Oxalat oder Succinat bevorzugt.

C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl steht im allgemeinen für einen verzweigten oder unverzweigten Kohlenwasserstoffrest mit 1 bis 6 Kohlenstoffatom(en), der gegebenenfalls mit einem oder mehreren Halogenatom(en) - vorzugsweise Fluor - substituiert sein kann, die untereinander gleich oder verschieden sein können. Als Beispiele seien folgende Kohlenwasserstoffreste genannt:

Methyl, Ethyl, Propyl, 1-Methylethyl (iso-Propyl), Butyl, 1-Methylpropyl, 2-Methylpropyl, 1,1-Dimethylethyl, n-Pentyl, 1-Methylbutyl, 2-Methylbutyl, 3-Methylbutyl, 1,1-Dimethylpropyl, 1,2-Dimethylpropyl, 2,2-Dimethylpropyl, 1-Ethylpropyl, Hexyl, 1-Methylpentyl, 2-Methylpentyl, 3-Methylpentyl, 4-Methylpentyl, 1,1-Dimethylbutyl, 1,2-Dimethylbutyl, 1,3-Dimethylbutyl, 2,2-Dimethylbutyl, 2,3-Dimethylbutyl, 3,3-Dimethylbutyl, 1-Ethylbutyl, 2-Ethylbutyl, 1,1,2-Trimethylpropyl, 1,2,2-Trimethylpropyl, 1-Ethyl-1-methylpropyl und 1-Ethyl-2methyl-propyl.

Höherer Alkylrest steht für einen verzweigten oder unverzweigten C<sub>7</sub>-C<sub>20</sub>-Alkylrest der gegebenenfalls mit einem oder mehreren Halogenatom(en) - vorzugsweise Fluor - substituiert sein kann, die untereinander gleich oder verschieden sein können. Als Beispiele seien folgende Kohlenwasserstoffreste genannt: verzweigtes oder unverzweigtes Heptyl, Octyl, Nonyl, Decyl, Undecyl, Dodecyl, Tetradecyl, Hexadecyl, Dodecadecyl und Eicosyl.

C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkenyl steht im allgemeinen für einen verzweigten oder unverzweigten Kohlenwasserstoffrest mit 3 bis 6 Kohlenstoffatom(en), mit einer oder ggf. mehreren Doppelbindungen, der gegebenenfalls mit einem oder mehreren Halogenatom(en) - vorzugsweise Fluor - substituiert sein kann, die untereinander gleich oder verschieden sein können. Als Beispiele seien folgende Kohlenwasserstoffreste genannt:

2-Propenyl (Allyl), 2-Butenyl, 3-Butenyl, 1-Methyl-2-propenyl, 2-Methyl-2-propenyl, 2-Pentenyl, 3-Pentenyl, 4-Pentenyl, 1-Methyl-2-butenyl, 2-Methyl-2-butenyl, 3-Methyl-2-butenyl, 1-Methyl-3-butenyl, 2-Methyl-3-butenyl, 3-Methyl-3-butenyl, 1,1-Dimethyl-2-propenyl, 1,2-Dimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-2-propenyl, 2-Hexenyl, 3-Hexenyl, 4-Hexenyl, 5-Hexenyl, 1-Methyl-2-pentenyl, 2-Methyl-2-pentenyl, 3-Methyl-2-pentenyl, 4-Methyl-2-pentenyl, 1-Methyl-3-pentenyl, 2-Methyl-3-pentenyl,

3-Methyl-3-pentenyl, 4-Methyl-3-pentenyl, 1-Methyl-4-pentenyl, 3-Methyl-4-pentenyl, 4-Methyl-4-pentenyl, 1,1-Dimethyl-2-but enyl, 1,1-Dimethyl-2-but enyl, 1,1-Dimethyl-3-but enyl, 1,2-Dimethyl-2-but enyl, 1,2-Dimethyl-3-but enyl, 1,3-Dimethyl-2-but enyl, 1,3-Dimethyl-3-but enyl, 2,2-Dimethyl-3-but enyl, 2,3-Dimethyl-2-But enyl, 2,3-Dimethyl-3-but enyl, 1-Ethyl-2-but enyl, 1-Ethyl-3-but enyl, 2-Ethyl-1-but enyl, 2-Ethyl-2-but enyl, 2-Ethyl-3-but enyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propenyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propenyl und 1-Ethyl-2-methyl-2-propenyl.

$C_3-C_6$ -Alkinyl steht im allgemeinen für einen verzweigten oder unverzweigten Kohlenwasserstoffrest mit 3 bis 6 Kohlenstoffatom(en), mit einer oder ggf. mehreren Dreifachbindungen, der gegebenenfalls mit einem oder mehreren Halogenatom(en) - vorzugsweise Fluor - substituiert sein kann, die untereinander gleich oder verschieden sein können. Als Beispiele seien folgende Kohlenwasserstoffreste genannt:

2-Propinyl (Propargyl), 2-Butinyl, 3-Butinyl, 1-Methyl-2-propinyl, 2-Methyl-2-propinyl, 2-Pentinyl, 3-pentinyl, 4-Pentinyl, 1-Methyl-2-butinyl, 2-Methyl-2-butinyl, 3-Methyl-2-butinyl, 1-Methyl-3-butinyl, 2-Methyl-3-butinyl, 3-Methyl-3-butinyl, 1,1-Dimethyl-2-propinyl, 1,2-Dimethyl-2-propinyl, 1-Ethyl-2-propinyl, 2-Hexinyl, 3-Hexinyl, 4-Hexinyl, 5-Hexinyl, 1-Methyl-2-pentinyl, 2-Methyl-2-pentinyl, 3-Methyl-2-pentinyl, 4-Methyl-2-pentinyl, 1-Methyl-3-pentinyl, 2-Methyl-3-pentinyl, 3-Methyl-3-pentinyl, 4-Methyl-3-pentinyl, 1-Methyl-4-pentinyl, 3-Methyl-4-pentinyl, 4-Methyl-4-pentinyl, 1,1-Dimethyl-2-butinyl, 1,1-Dimethyl-3-butinyl, 1,2-Dimethyl-2-butinyl, 1,2-Dimethyl-3-butinyl, 1,3-Dimethyl-2-butinyl, 1,3-Dimethyl-3-butinyl, 2,2-Dimethyl-3-butinyl, 2,3-Dimethyl-2-butinyl, 2,3-Dimethyl-3-butinyl, 1-Ethyl-2-butinyl, 1-Ethyl-3-butinyl, 2-Ethyl-1-butinyl, 2-Ethyl-2-butinyl, 2-Ethyl-3-butinyl, 1,1,2-Trimethyl-2-propinyl, 1-Ethyl-1-methyl-2-propinyl und 1-Ethyl-2-methyl-2-propinyl.

Aryl steht - steht sofern nicht anders definiert - für einen aromatischen ein- oder mehrkernigen Rest mit 4 bis 22 C-Atomen, der ggf. ein oder zweit Heteroatome enthalten kann. Als Beispiele seien genannt: Phenyl, Naphthyl, Anthracyl bzw. Pyrol, Furan, Thiophen, Pyridin, Pyridazin, Pyrimidin oder Pyrazin, und der ggf. durch Halogen (F, Cl, Br, J) - vorzugsweise Fluor- oder durch eine Alkylgruppe unabhängig voneinander ein- oder mehrfach substituiert sein kann.

Aralkyl bedeutet einen ein oder mehrkernigen Arylrest im Sinne der vorstehenden Definition der über eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkylen-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkenylen- oder eine C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkinylengruppe, für welche die Definition der C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-, C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Akenyl und C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>-Alkinylgruppen entsprechend gelten, an die kationische Partialstruktur gebunden ist. Im Sinne der vorliegenden Erfindung wird die Benzylgruppe bevorzugt.

Als Gegenionen X<sup>-</sup> eignen sich bevorzugt alle Anionen von Halogenwasserstoffsäuren oder Anionen ein- oder zweibasischer organischer Säuren wie Acetat oder Oxalat, Malonat, Succinat oder Citrat.

Als Protonendonoren im Sinne der vorliegenden Erfindung sind in erster Linie gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren, ungesättigte Alkenyl-carbonsäuren, gesättigte und/oder ungesättigte aliphatische C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Dicarbonsäuren, aliphatische Ketocarbonsäuren oder Ketodicarbonsäuren sowie Aminosäuren neben Mineralsäuren oder deren Salze allein oder in Kombination geeignet. Dabei können alle genannten organischen Säuren in unsubstituierter Form oder als substituierte Derivate eingesetzt werden, worunter - sofern nicht anders angegeben - die unsubstituierten oder ein bzw. mehrfach durch Hydroxyl-Gruppen substituierten Derivate bevorzugt werden.

Als gesättigte aliphatische Monocarbonsäuren im Sinne der vorliegenden Erfindung werden neben Ameisensäure vorzugsweise C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-carbonsäuren verstanden, worunter Essigsäure, Propionsäure, n-Buttersäure, n-Valeriansäure, Isovaleriansäure, Ethyl-methyl-essigsäure (2-Methyl-buttersäure), 2,2-Dimethylpropionsäure (Pivalinsäure), n-Hexansäure, n-Octansäure, n-Decansäure sowie n-Dodecansäure (Laurinsäure) bevorzugt werden. Daneben können auch die sich von den genannten Säuren sich ableitenden Ketocarbonsäuren Verwendung finden.

Als ungesättigte Alkenyl-carbonsäuren im Sinne der Erfindung seien beispielsweise Acrylsäure (Propensäure), Methacrylsäure, Crotonsäure, iso-Crotonsäure sowie Vinylsäure genannt.

Bevorzugt im Sinne der vorliegenden Erfindung sind gesättigte aliphatische C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Dicarbonsäuren, wie zum Beispiel Oxalsäure, Malonsäure, Bersteinsäure, Glutarsäure oder Adipinsäure, worunter Oxalsäure und Bersteinsäure ganz besonders bevorzugt werden.

Besonders bevorzugt werden zur Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe aliphatische Hydroxi-di- und -tricarbonsäuren eingesetzt, worunter Tartronsäure, D-(+)-, L-(-)- oder DL-Äpfelsäure, (2R, 3R)-(+)-Weinsäure, (2S, 3S)-(-)-Weinsäure, meso-Weinsäure und Citronensäure ganz besonders bevorzugt werden.

Zur Lösung der vorliegenden Erfindungen eignen sich daneben auch ungesättigte Dicarbonsäuren wie Malein- oder Fumarsäure oder ungesättigte Tricarbonsäuren, wie zum Beispiel Aconitsäure.

Im Sinne der vorliegenden Erfindung können jedoch auch aliphatische Ketodicarbonsäuren als Additive eingesetzt werden, wie z. B. Mesoxalsäure und Oxalessigsäure, worunter Oxalessigsäure ganz besonders bevorzugt wird.

Des weiteren können im Sinne der vorliegenden Erfindung Aminosäuren eingesetzt werden, worunter  $\alpha$ -Aminosäuren - wie z. B. Aminoessigsäure (Glycin),  $\alpha$ -Aminopropionsäure (Alanin),  $\alpha$ -Amino-*iso*-valeriansäure (Valin),  $\alpha$ -Amino-*iso*-capronsäure (Leucin) und  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -methylvaleriansäure (Isoleucin) bevorzugt werden. Besonders bevorzugt findet dabei Glycin Verwendung.

Die genannte Protonendonoren können als Einzelsubstanzen bzw. in Form der reinen Stereoisomeren als auch in Mischungen eingesetzt werden.

Als weitere Additive können im Sinne der vorliegenden Erfindung ebenfalls Mineralsäuren und deren Salze eingesetzt werden. Bevorzugt kommen dabei deren Salze von Mineralsäuren - wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure - mit Alkalimetallen oder deren Ammoniumsalze zur Anwendung. Besonders bevorzugt finden dabei Phosphorsäure und Ammoniumsulfat Verwendung.

Als Nukleinsäuren werden im Sinn der vorliegenden Erfindung Nukleinsäuren im breiteren Sinne verstanden, so z. B. Ribonukleinsäuren (RNA) wie auch Desoxyribonukleinsäuren (DNA) in allen Längen und Konfigurationen, wie Doppelstrang, Einzelstrang, circulär und linear, verzweigt usw. umfassen und alle möglichen Unterarten, wie z. B. monomere Nukleotide, Oligomere, Plasmide, virale und bakterielle DNA und RNA, sowie genomische und nichtgenomische DNA und RNA aus Tier- und Pflanzenzellen oder anderen Eukaryonten, mRNA in prozessierter und unprozessierter Form, tRNA, hn-RNA, rRNA, cDNA sowie alle anderen denkbaren Nukleinsäuren einschließen.

Als biologische Probe mit Nukleinsäuren können zellfreies Probenmaterial, Plasma, Körperflüssigkeiten, wie beispielsweise Blut, Serum, Zellen, Leukozytenfraktionen, Crusta Phlogistica, Sputum, Urin, Sperma, Faeces, Abstriche, Punktate, Gewebeproben jeder Art - wie z. B. Biopsien -, Gewebeteile und Organe, Lebensmittelproben, die freie oder gebundene Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-haltige Zellen enthalten, Umweltproben, die freie oder gebundene Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-haltige Zellen enthalten - wie z. B. Organismen (Ein- oder Mehrzeller; Insekten etc.), Pflanzen und Pflanzenteile, Bakterien, Viren, Hefen und andere Pilze, andere Eukaryonten und Prokaryonten etc., wie sie beispielsweise in der Europäischen Patentanmeldung Nr. 95909684.3 offenbart sind, auf die hiermit inhaltlich Bezug genommen wird, oder auch freie Nukleinsäuren verwendet werden.

#### Zum technologischen Hintergrund der Erfindung:

Aus dem Stand der Technik ist hinlänglich bekannt, dass die genetische Herkunft und funktionelle Aktivität einer Zelle durch Studien ihrer Nukleinsäuren bestimmt und untersucht werden kann. Die Analysen der Nukleinsäuren und Proteine ermöglichen den direkten Zugriff auf die Ursache der Aktivitäten von Zellen. Sie sind somit indirekten, konventionellen Methoden, wie z. B. dem Nachweis von Stoffwechselprodukten, potentiell überlegen. So werden molekularbiologische Analysen bereits in vielen Bereichen eingesetzt, z. B. in der medizinischen und klinischen Diagnostik, in der Pharmazie bei der Entwicklung und Evaluierung von Arzneimitteln, in der Lebensmittelanalytik sowie bei der Überwachung der

Lebensmittelherstellung, in der Agrarwirtschaft bei der Züchtung von Nutzpflanzen und Nutztieren sowie in der Umweltanalytik und in vielen Forschungsgebieten.

Durch die Analyse der RNA, speziell der mRNA in Zellen, lassen sich die Aktivitäten von Genen direkt bestimmen. Die quantitative Analyse von Transkriptmustern (mRNA-Mustern) in Zellen durch moderne molekularbiologische Methoden, wie z. B. Echtzeit-Reverse-Transcriptase-PCR ("Real time RT PCR") oder Genexpressions-Chip-Analysen ermöglicht z. B. die Erkennung fehlerhaft exprimierter Gene, wodurch z. B. Stoffwechselkrankheiten, Infektionen oder die Entstehung von Krebs erkannt werden können. Die Analyse der DNA aus Zellen durch molekularbiologische Methoden, wie z. B. PCR, RFLP, AFLP, SNP oder Sequenzierung ermöglicht z. B. den Nachweis genetischer Defekte oder die Bestimmung des HLA-Typs sowie anderer genetischer Marker.

Die Analyse genomischer DNA und RNA wird auch zum direkten Nachweis von infektiösen Erregern, wie Viren, Bakterien usw. eingesetzt.

Unbedingte Voraussetzung für Nukleinsäureanalytik ist die sofortige Stabilisierung der Nukleinsäuren und Proteine nach Entnahme der biologischen Probe aus ihrer natürlichen Umgebung. Dies gilt für DNA und insbesondere RNA, die nach Entnahme der biologischen Probe sehr schnell abgebaut werden kann. Andererseits kann es nach der Entnahme der biologischen Probe durch Induktion z. B. von Stressgenen auch zur Synthese neuer mRNA-Moleküle kommen, wodurch das Transkriptmuster der Zellen verändert werden kann. Dadurch können nachfolgende Analysen verfälscht werden. Insbesondere im medizinischen Bereich ist die Stabilisierung von Nukleinsäuren notwendig, da hier häufig, z. B. in einer Praxis Nukleinsäure-haltige Proben genommen werden, die erst nach längerer Lagerung und einem Transport in ein Labor weiter untersucht werden können.

In der Zwischenzeit können sich die in den Proben enthaltenen Nukleinsäuren verändern oder sogar vollständig zersetzen. Dies beeinflußt natürlich das Ergebnis später durchgeföhrter Tests massiv oder macht diese gänzlich unmöglich. Für solche Tests werden molekularbiologische Techniken wie z. B. Northern- sowie Southern-Blot-Analyse, PCR, RT-PCR, SunRise, LCR, branched-DNA (bDNA),

SDA, DNA- und RNA-Chips und Arrays zur Genexpressions- und Mutationsanalyse, RFLP, AFLP, SNP-Analysen, cDNA-Synthesen, subtraktive Hybridisierung oder die Taqman-Technologie und weitere Echtzeitquantifizierungsverfahren eingesetzt. Auf der anderen Seite verkörpert die Verwendung von hochreiner, intakter Nukleinsäure - DNA oder RNA - ein Kriterium von fundamentaler Relevanz für die Anwendung bzw. Durchführung der oben genannten Tests. Daneben stellt die Isolierung der Nukleinsäure-haltigen Proben wie auch der Assays jeweils einen zeitaufwendigen Arbeitsschritt dar. Des weiteren kann die Kontamination eines auf dem Gebiet der Molekularbiologie arbeitenden Untersuchungslabors - wie sie z. B. bei einer fehlerhaften Versuchsdurchführung auftreten kann - zu fehlerhaften Untersuchungsergebnissen führen.

#### Zum Stand der Technik

Eine große Anzahl von Publikationen schlägt die Verwendung von Mischungen auf der Basis von Ethanol und Aceton als Fixative für die nachfolgende Isolierung von Nukleinsäure aus einer entsprechenden Proben - wie z. B. Gewebe - vor. Nach dem Studium dieser Literatur wird allerdings deutlich, dass derartige Ethanol/Aceton-Mischungen längst nicht alle Anforderungen, die an eine sichere RNA-Gewinnung gestellt werden, erfüllen können. So sind derartige Mischungen nicht in der Lage, die RNA vor dem Abbau zu schützen. Daneben wird nicht der Schutz der RNA in festen, aus umfangreicheren Zellverbänden aufgebauten Proben sichergestellt. Daneben sind die vorgeschlagenen Gemische leicht entzündlich bzw. explosionsgefährlich, was mit einem nicht unerheblichen Gefahrenmoment bei der Arbeit im Laboratorium verbunden ist.

Daneben befaßt sich ein mehr peripher relevanter Stand der Technik mit der Gewinnung von RNA aus fixierten bzw. konservierten Gewebeproben. Diese Abhandlungen haben im wesentlichen die Eignung von histologischen Präparaten zum Gegenstand, um die Signalstärke, die bei einer *in situ* Hybridisierung erreicht wird, zu maximieren. Mit anderen Worten: derartige Experimente dienen eher dazu, RNA nachzuweisen anstatt sie zu konservieren [US-Patente 5 196 182 und 5 260 048].

Andere Berichte haben die Gewinnung von fragmentierter RNA oder DNA aus einem fixierten Gewebe zum Gegenstand, um die so erhaltenen Fragmente in einer - eingeschränkten - molekularen Analyse mit Hilfe der PCR unterziehen zu können. Um eine derart fragmentierte DNA bzw. RNA erhalten zu können werde die entsprechenden Proben gewöhnlich mit Proteinase K behandelt, um die strukturgebenden Gewebekomponenten abbauen zu können; erst danach wird die RNA mit einer Guanidiniumsalz-haltigen Lösung extrahiert. Allerdings ist die auf diese Art und Weise aus fixiertem Gewebe erhaltene RNA von geringer Qualität und weist nur eine Größe von ca. 200 Basen auf. Dies ist gemäß dem Stand der Technik auf eine gewisse Anzahl von bestimmten Faktoren zurückzuführen, die u.a. den nachteiligen Einfluß von endogener sowie Vernetzungsreaktionen der DNA bzw. RNA innerhalb der intrazellulären Matrix während der Fixierung umfassen. Basierend auf dem Umstand, dass die DNA bzw. RNA in der überwiegenden Mehrzahl der Fälle zumindest partiell abgebaut ist, kann eine so gewonnene DNA bzw. RNA nicht mehr erfolgreich in einer Northern-Analyse eingesetzt werden. Eine derart isolierte RNA könnte höchstens noch mit gewissen Erfolgsaussichten in einer RT-PCR-Reaktion eingesetzt werden, dort aber nur zur Amplifikation relativ kleiner Fragmente.

Ferner ist dem Stand der Technik die Verwendung von Ammoniumsulfat zur Konservierung von RNA bei Temperaturen oberhalb des Gefrierpunkts zu entnehmen [WO 00/06780]. Ein derartige Komposition hat unter der Bezeichnung RNA/*later* Eingang in den Stand der Technik gefunden. Allerdings sind derartige wässrige Ammoniumsulfat-Lösungen nicht dazu geeignet RNA in Blut, Plasma oder Seren zu stabilisieren. Aufgrund des Umstandes, dass die genannten Proben eine hohe Proteinkonzentration aufweisen, wird beim Kontakt mit derartigen Ammoniumsalz-Lösungen sofort ein schwerlöslicher Niederschlag gebildet [RNA/*later* Produktinformation der Firma Ambion, Austin, Texas (USA)].

Des weiteren ist aus seit geraumer Zeit aus dem Stand der Technik bekannt, sog. kationische Verbindungen zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Proben einzusetzen. Derartige Anwendungen werden u.a. in den US-Patenten 5,010,183 und US 5,300,635, sowie in der europäischen Patentschrift EP 0442026 beschrieben. In den genannten Dokumenten wird die biologische Probe jeweils nur

im Rahmen der für eine Probenvorbereitung üblichen Inkubationszeiten, d.h. im Bereich von Minuten, mit der kationischen Verbindung inkubiert; anschließend wird die Nukleinsäure weiter aufgereinigt.

Eine Überprüfung der aus dem Stand der Technik bekannten Verbindungen hat ergeben, die in dem Stand der Technik genannten kationischen Verbindungen - insbesondere das in den US-Patenten offenbare Tetradecyltrimethylammonium Oxalat - alleine keine ausreichende Stabilisierung zellulärer RNA - beispielsweise bei der längeren Lagerung von Blut gewährleisten.

Zwar sind dem Stand der Technik Versuche bekannt beispielsweise Viren in Blut über einen Zeitraum von mehreren Tage zu stabilisieren, doch ist diesen Befunden keinerlei Hinweis über die Unversertheit der RNA zu entnehmen. So beschreiben Schmidt und MacFarlane [J. Medical Virology 47, (1995) 153] die Stabilisierung von Hepatitis C Viren in Blut mittels Catrimox-14™ für sieben Tage bei Raumtemperatur. Der Nachweis der Viren erfolgte dabei mittels RT-PCR Amplifikation eines 250 Bp langen Fragmentes des HCV-Genomes. Der dort offenbare Nachweis liefert jedoch kein ausreichendes Kriterium für die Intaktheit der RNA, da nur ein kurzes Fragment amplifiziert wurde. Außerdem wurde der Versuch mit einer Probe unbestimmter Viruslast durchgeführt, so dass keine Aussagen über einen Abbau von Virus-RNA während der Lagerung gemacht werden konnten.

Daneben wird in der Internationalen Patentanmeldung WO 99/29904 die Stabilisierung von DNA in Körperflüssigkeiten unter Verwendung von EDTA, EGTA oder BAPTA in Kombination mit Guanidin Hydrochlorid, Guanidin-Thiocyanat, Lithiumchlorid, Manganchlorid, Sarkosyl, SDS, Natriumperchlorat, Natriumsalicylat und Natriumthiocyanat beschrieben. Außerdem ist dem Stand der Technik zu entnehmen, dass phenolhaltige Reagenzien wie z. B. Trizol™ zur Stabilisierung von RNA während der Lagerung verwendet werden können. - Alle diese Reagenzien sind jedoch sehr gesundheitsschädlich und damit nicht für Routineanwendungen geeignet.

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, eine Komposition zur Verfügung zu stellen, welche die Stabilisierung von RNA in Gegenwart von Gewebe bzw. Blut, Plasma oder Serum zur Verfügung zu stellen.

Der vorliegenden Erfindung liegt daneben die Aufgabe zugrunde, eine Komposition in Form einer Stabilisierungslösung bereit zu stellen, deren Bestandteile nicht gesundheitsschädlich sind und damit z. B. auch für eine Stabilisierung von biologischem Probenmaterial während des Transportes vom Ort der Entnahme zu einem Labor ohne Gesundheitsgefahren für das mit der Probenbearbeitung befaßte Personal eingesetzt werden kann.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht daneben darin, eine Komposition in Form einer Stabilisierungslösung zur Verfügung zu stellen in der die Voraussetzung erfüllt wird, dass auch das Stabilisierungsreagenz selbst in Lösung stabil bleibt und keinerlei Vorbehandlung - wie z. B. das Auflösen schwerlöslicher Präzipitate - beim Anwender erforderlich macht. Derartige Vorbehandlungen sind stets mit der Gefahr der Variation in der Stabilisierungseffizienz verbunden.

Eine weitere Aufgabe der vorliegenden Erfindung besteht darin, eine Komposition zur Verfügung zu stellen, die vielseitig einsetzbar ist, d. h.: die bei einem großen Spektrum biologischer Proben angewendet werden kann.

Überraschenderweise wurde nun festgestellt, dass die Stabilisierung von Nukleinsäuren über einen längeren Zeitraum gelingt, wenn man die Nukleinsäuren einer biologischen Probe mit einer kationischen Verbindung wie sie u.a. in den US-Patenten 5 010 183, und 5 300 645 offenbart sind, in Kontakt bringt und erfindungsgemäß mit einem oder mehreren der eingangs beschriebenen Additive versetzt. Additive, die sich bevorzugt für die Lösung der erfindungsgemäßen Aufgabe eignen, sind in Tab. 1 aufgeführt:

Tabelle 1

Bezeichnung	Formel
Essigsäure	CH <sub>3</sub> -COOH
Oxalsäure	HOOC-COOH
Malonsäure	HOOC-CH <sub>2</sub> -COOH
Tartronsäure	HOOC-CHOH-COOH
Bernsteinsäure	HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
Äpfelsäure	HOOC-CHOH-CH <sub>2</sub> -COOH
Weinsäure	HOOC-CHOH-CHOH-COOH
Glutarsäure	HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
Adipinsäure	HOOC-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
Zitronensäure	HOOC-CH <sub>2</sub> -COHCOOH-CH <sub>2</sub> -COOH
Maleinsäure	HOOC-CH=CH-COOH
Oxalessigsäure	HOOC-CO-CH <sub>2</sub> -COOH
Glycin	H <sub>2</sub> N-CH <sub>2</sub> -COOH
Ammoniumsulfat	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Phosphat	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> K und Na Salz

Das Additiv kann in unterschiedlichen Konzentrationen in dem Stabilisierungsreagenz vorliegen; beispielsweise kann es in Mischungen der Stabilisierungslösung mit Blut in einem Volumenverhältnis von 1:1 - bevorzugt 3:1 in einer Konzentration von 50mM bis zur Sättigung , bevorzugt 100 bis 1M und besonders bevorzugt in einer Konzentration von 200 - 500 mM zugegen sein. Dabei können in Abhängigkeit von der Natur des Additivs sich andere Konzentrationsbereiche als vorteilhaft erweisen . Daneben ist auch der Einsatz von Kombinationen verschiedener Additive möglich.

Die kationische Verbindung weist in der wässrigen Lösung der Komposition eine Konzentration in einem Bereich 0,01 Gew.-% und Sättigung, bevorzugt zwischen 0,1 Gew.-% und Sättigung und besonders bevorzugt zwischen 0,5 Gew.-% und 15 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 Gew.-% und 10 Gew.-% auf.

Naturgemäß werden bei der Zugabe einer Lösung von kationischer Verbindungen und Additiv die jeweiligen optimalen Konzentrationen durch das Volumen der biologischen Probe und das Volumenverhältnis von Stabilisierungslösung zur biologischen Probe bestimmt.

Der pH-Wert der Mischung aus kationischer Verbindung und Additiv kann in Abhängigkeit von der Probe im allgemeinen über einen weiten pH Bereich (pH 2 bis 12) variiert werden und liegt bevorzugt in einem Intervall von pH 2 bis pH 10 und besonders bevorzugt in einem Intervall von pH 3 bis 8. Dabei ist der bevorzugte pH-Bereich abhängig von der eingesetzten biologischen Probe. - Für Blut, Plasma und Serum ist ein pH-Wert in einem Bereich zwischen pH 2 und pH 6 und besonders zwischen pH 3 und pH 4 bevorzugt.

Für biologische Proben wie andere zelluläre Körperflüssigkeiten außer Blut, Plasma und Serum, oder z. B. Bakterien, Punktate, Zellen, Gewebe und weiterer biologischer Proben - wie oben beschrieben - liegt der pH-Wert in der Stabilisierungslösung bestehend aus kationischer Verbindung und Additiv bevorzugt in einem Bereich von pH 3 bis pH 10 und besonders bevorzugt in einem Intervall von pH 4 bis pH 8.

Zur Stabilisierung von Nukleinsäuren in biologischen Proben kann die Probe mit einer Lösung, welche die kationische(n) Verbindung(en) und Additive enthält, vermischt werden. Dabei ist ein Zugabevolumen von 0,1 bis 10.000 Volumen der biologischen Probe möglich; bevorzugt wird ein Zugabevolumen in einem Bereich von 1 bis 1000 und ganz besonders bevorzugt in einem Intervall von 1 bis 100 Volumen. In Abhängigkeit von der Art der Probe - wie beispielsweise Proben aus feinen Nadelbiopsien oder Niedrigzellkulturen können jedoch u.U. auch wesentlich höhere Volumina in Frage kommen

Ebenso können die oben genannten kationischen Verbindungen und Additive auch als Feststoff zugesetzt werden, wenn die biologische Probe selbst Flüssigkeit zur Lösung des Feststoffes enthält (wie z. B. zellhaltige Körperflüssigkeiten, Zellen in Medium, Urin) oder Flüssigkeit, z. B. Wasser, zur Lösung des Feststoffes hinzugegeben wird. Die Zugabe als Feststoff bietet den Vorteil, dass Feststoffe meist chemisch stabiler sind und ihre Zugabe zur Probe oft einfacher durchführbar ist.

Darüber hinaus ist insbesondere bei sehr kompakten biologischen Proben, wie beispielsweise Geweben, eine Zerkleinerung bzw. Homogenisation der Probe in der Stabilisierungslösung bzw. vor Mischung mit der Stabilisierungslösung möglich, um durch z. B. mechanische, chemische, physikalische oder enzymatische Einwirkung auf die Probe die Freisetzung der Nukleinsäuren oder einzelner Zellen bzw. Zellverbände durch Zerstörung einer kompakten Probe zu unterstützen. Eine mechanische Einwirkung kann z. B. mit einem elektrischen Messer, einer Kugelmühle oder durch Pressen durch eine Spritze geschehen, während sich geeignete Enzyme zur Einwirkung auf die Probe beispielsweise Hydrolasen, Proteasen oder Lipasen anbieten.

Daneben kann die Probe auf rein physikalischem Wege - beispielsweise mittels Ultraschall vorbehandelt werden.

Die Vorbehandlung kann des weiteren auf chemischen Wege - entweder allein oder in Kombination mit rein physikalischen Methoden - erfolgen. Als Mittel zur Unterstützung der Lyse können z. B. aliphatische Alkohole - insbesondere Isopropanol - oder Aldehyde bzw. Dialdehyde - wie z. B. Glyoxal - oder auch Phenole oder Phenolderivate - wie z. B. 2-Biphenylool oder ionische, zwitterionische und nicht-ionische Verbindungen, - wie z. B. Sulphydryl - oder reduzierende Reagenzien - wie z. B. Dithiothreitol und  $\beta$ -Mercaptoethanol - oder Phosphorsäurederivate - wie z. B. Tributylphosphat - oder aber chaotrope Reagenzien, wie z. B. Harnstoff, Guanidinium-thiocyanat oder Guanidinium-hydrochlorid - oder Salze einzeln oder in Kombination verwendet werden.

Weitere Möglichkeiten zur mechanischen, chemischen, physikalischen oder enzymatischen Einwirkung auf Proben sind dem Fachmann bekannt und sollen hier umfaßt sein.

Die Lagerung des Probenmaterials kann - den jeweiligen Bedürfnissen folgend - über längere Zeiträume, wie z. B. von 1 bis zu 14 Tage oder länger, bei Raumtemperatur aber auch bei erhöhten Temperaturen, wie z. B. 40°C oder mehr,

und auch bei erniedrigten Temperaturen wie z. B. 4°C oder -20°C oder weniger erfolgen.

Im Anschluß an die Lagerung der biologischen Probe in der Lösung der o. g. Verbindungen können entweder direkt Nukleinsäure-Analysetechniken angeschlossen werden, oder es kann eine Aufreinigung der Nukleinsäuren aus der Probe stattfinden.

Eine direkte Detektion/Analytik von Nukleinsäuren ist beispielsweise in Blotting-Techniken, gelelektrophoretischen Methoden zur Auf trennung von Biomolekülen und durch chromatographische Methoden zu sehen.

Zur Aufreinigung der Nukleinsäuren aus der biologischen Probe werden die freien Nukleinsäuren oder Nukleinsäure-haltige Zellen oder Partikel z. B. durch Zentrifugation oder Filtration von der restlichen Lösung abgetrennt und einer weiteren Aufreinigung zugeführt, die vorteilhaft in einem geringen Volumen stattfinden kann, wie in den US-Patenten US 5.010.183, US 5.300.645 und in der Europäischen Patentanmeldung mit der Anmeldenummer 99103457.0 beschrieben.

Die direkte Abtrennung der Nukleinsäuren bzw. der Nukleinsäure-haltigen Zellen oder Partikel im Lagerungsgefäß ermöglicht dabei die Einsparung zusätzlicher Schritte zur Überführung der Probe in andere Gefäße zur Aufreinigung und vermindert somit sowohl Probenverluste als auch die Gefahr von Verwechslungen und von Kontamination durch Verschleppungen von Nukleinsäuren von Probe zu Probe. Die Anwendung dieser Stabilisierungsreagenzien ermöglicht somit ein 1-Schritt-Verfahren zur Stabilisierung und direkten Isolierung von Nukleinsäuren in biologischen Proben, wobei RNA und DNA alternativ aus der biologischen Probe oder parallel aus einer Probe isoliert werden kann.

Durch die Stabilisierung von Nukleinsäuren mit Hilfe der erfindungsgemäßen Komposition aus einer oder mehreren kationischen Verbindung(en) und einem oder mehreren Additiv(en) wird erreicht, dass die Nukleinsäuren in einer Probe auch bei längerer Lagerung oder während eines Transports sich nicht verändern. Somit wird

die Genauigkeit später durchgeföhrter Tests deutlich erhöht. In bestimmten Fällen, wenn z. B. das Probenmaterial über weite Strecken transportiert oder länger gelagert werden muß - macht das erfindungsgemäße Verfahren diese Tests nach einem derartigen Zeitraum überhaupt erst möglich.

Die Vorteile dieser Erfindung liegen insbesondere sowohl im Bereich der Forschung, z. B. für die Analyse von Transkriptspiegeln, die direkt nach der Entnahme fixiert werden müssen, als auch im Bereich klinischer Analysen - wie z. B. molekulare Diagnostik -, wo Patientenproben nach der Entnahme während Lagerung und Transport bis zur Analyse ebenfalls stabilisiert werden müssen. Insbesondere findet die Isolierung und Stabilisierung von Nukleinsäuren Anwendung in der Tumordiagnostik, in der Diagnostik erblich bedingter Krankheiten sowie in der Virusdiagnostik und dem Virus-Monitoring und der Diagnose und dem Monitoring anderer infektiöser Erreger, sowie in der Analyse von Genexpressionsmustern.

Die Anwendungsbereiche der vorliegenden Erfindung erstrecken sich dabei nicht nur auf medizinische bzw. zoologische Anwendungsfelder, sondern umfassen auch die Analyse botanischer, pilzlicher und prokaryotischer Systeme. Die Stabilisierung und Isolierung von Nukleinsäuren aus Pflanzen und Pflanzenteilen, Algen, Pilzen sowie Bakterien aus Kulturen und natürlichen Habilitaten finden im Bereich der Forschung Anwendung, z. B. für die Analyse von Transkriptspiegeln und Genexpressionsmustern sowie zur Identifizierung und Quantifizierung von Spezies in komplexen Populationen, beispielsweise von Bakterien in einer Bodenprobe.

Darüber hinaus erstreckt sich das Anwendungspotential auch auf weitere Analytische Bereiche wie z. B. auf die Lebensmittelanalytik.

Die vorliegende Erfindung wird anhand folgenden Beispiele sowie der Figs. erläutert. In der Beschreibung und in den Beispielen werden die folgenden Abkürzungen verwandt:

AFLP Längenpolymorphismus amplifizierter Fragmente  
A. dest. Destilliertes Wasser

BAPTA	1,2-Bis(2-aminophenoxy)ethan-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EcoRI	Restriktionsenzym Escherichia coli Stamm R
$E_{260}/E_{280}$	Quotient der Extinktionen bei 260 und 280 nm
EDTA	Ethyldiamin-N,N,N',N'-tetraessigsäure
EGTA	[Ethylenbis(oxyethylenenitrilo)]tetraessigsäure
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
Hind III	Restriktionsenzym Haemophilus influenzae
hugl	human homologue of giant larvae
IFN- $\gamma$	Interferon-gamma
LM	Längenmarker
MOPS	3-(N-Morpholino)-2-hydroxypropansulfonsäure
nb	nicht bestimmt
Nonidet P40	Imbentin-N/52; Octylphenylpolyethylenglycol
OD	optische Dichte
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
RFLP	Restriktionsfragment-Längen-Polymorphismus
rpm	Umdrehungen pro Minute
mRNA	messenger RNA
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transcriptase PCR
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SSC	Kochsalz/Natriumcitrat-Lösung
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol
U	Einheiten

Nicht aufgeführte Abkürzungen - wie z.B. h für Stunde(n) - sind dem Fachmann in ihrer Bedeutung geläufig bzw. durch ihre Verwendung im Stand der Technik hinreichend bekannt.

Erläuterungen zu den Figuren und den ihnen zugrunde liegenden Experimenten

**Fig. 1** zeigt die Stabilisierung der RNA in Blut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat (TTAOx) in verschiedenen Carbonsäure-Puffern unterschiedlicher pH-Werte

**Fig. 2** zeigt die Stabilisierung der RNA in Vollblut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, gepuffert mit Weinsäure pH 3 in unterschiedlichen Konzentrationen.

**Fig. 3** zeigt die Stabilisierung der RNA in Vollblut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gepuffert mit 250 mM Weinsäure pH 3.

**Fig. 4** zeigt die Stabilisierung von RNA in Vollblut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, gepuffert mit Weinsäure pH 3,7 als Ergebnis einer Northern-Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten Sonde für die mRNA des GAPDH-Gens (A) und des IFN- $\gamma$ -Gens (B). Auch nach Lagerung über einen Zeitraum von 72 h ist in diesem Experiment die mRNA des GAPDH-Gens und des IFN- $\gamma$ -Gens nachweisbar.

**Fig. 5** zeigt die Stabilisierung der genomischen DNA in Blut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gepuffert mit Weinsäure bei pH 3,7.

Neben der zellulären RNA kann mit dem hier entwickelten Verfahren auch die genomische DNA aus den weißen Blutkörperchen stabilisiert und anschließend durch Bindung an eine Silica-Membran isoliert werden. Fig. 5 zeigt, dass auch nach Lagerung für 72 h hochmolekulare DNA (Länge > 20 kB) isoliert wird.

**Fig. 6** zeigt die Resultate bei der Verwendung der genomischen DNA in enzymatischen Reaktionen. Die nach Lagerung für 24 bzw. 72 Stunden isolierte

DNA (siehe Beispiel 5) wird in verschiedenen enzymatischen Reaktionen eingesetzt.

A. Je 2 µg der DNA werden mit 6 U der Restriktionsenzyme EcoRI (E) bzw. Hind III (H) für 3 h bei 37°C geschnitten und anschließend auf einem 0,8 %-igen Agarose/TBE-Gel aufgetrennt. Zur Kontrolle ist jeweils die ungeschnittene DNA ausgetragen.

B. Jeweils 150 bzw. 300 ng der genetischen DNA werden in eine PCR Reaktion eingesetzt (Gesamtvolumen 50 µl), bei der ein 1,1 kB langes Fragment des hugl-Gens (human homologue of giant larvae) amplifiziert wird. Die PCR-Produkte werden auf einem 1,2 %-igen Agarose/TBE-Gel aufgetrennt.

**Fig. 7** zeigt die Stabilisierung von RNA in Plasma mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven. Dabei werden alle Proben in Form von Doppelbestimmungen angesetzt: je 30 µl der Eluate werden in einem 1% Agarose-Formaldehyd-MOPS-Gel aufgetrennt. Die jeweiligen Proben sind in Tabelle 2 beschrieben.

**Fig. 8** zeigt die RNA-Stabilisierung in Plasma mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit Wein- bzw. Tartronsäure über verschiedene Zeiträume.

Dabei werden alle Proben in Form von Doppelbestimmungen angesetzt je 30 µl der Eluate werden in einem 1% Agarose-Formaldehyd-MOPS-Gel aufgetrennt. - Die jeweiligen Proben sind in Tabelle 3 beschrieben.

**Fig. 9** zeigt die RNA-Stabilisierung in 1 ml Plasma mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven.

Dabei werden alle Proben in Form von Doppelbestimmungen angesetzt je 30 µl der Eluate werden in einem 1% Agarose-Formaldehyd-MOPS-Gel aufgetrennt.

Die jeweiligen Proben sind in Tabelle 4 beschrieben.

**Fig. 10** zeigt die RNA-Stabilisierung in Hela-Zellen mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven.

Dabei werden die Proben in Form von Doppelbestimmungen angesetzt, die Proben 14, 40, 66 und 92 als Einfachbestimmung je 20 µl der Eluate werden in einem 1% Agarose-Formaldehyd-MOPS-Gel aufgetrennt. Die jeweiligen Proben sind in Tabelle 5 beschrieben.

**Fig. 11** zeigt die RNA-Stabilisierung in unterschiedlichen Mengen von Hela-Zellen. Dabei werden alle Proben in Form von Doppelbestimmungen angesetzt je 20 µl der Eluate werden in einem 1% Agarose-Formaldehyd-MOPS-Gel aufgetrennt. Die jeweiligen Proben sind in Tabelle 7 beschrieben.

**Fig. 12** zeigt die RNA-Stabilisierung in Macrophagen. Dabei werden alle Proben in Form von Doppelbestimmungen angesetzt. Je 20 µl der Eluate werden in einem 1% Agarose-Formaldehyd-MOPS-Gel aufgetrennt. Die jeweiligen Proben sind in Tabelle 9 beschrieben.

**Fig. 13** zeigt die RNA-Stabilisierung in adhärenten Hela-Zellen ohne Entfernung des Mediums. Dabei werden je 20 µl der Eluate werden in einem 1% Agarose-Formaldehyd-MOPS-Gel aufgetrennt. Die jeweiligen Proben sind in Beispiel 13 beschrieben.

**Fig. 14** zeigt die RNA-Stabilisierung in Nierengewebe mittels Tetradecyltrimethyl-Ammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven. Dabei werden alle Proben in Form von Doppelbestimmungen angesetzt; je 20 µl der Eluate werden in einem 1% Agarose-Formaldehyd-MOPS-Gel aufgetrennt. Die jeweiligen Proben sind in Tabelle 12 beschrieben.

**Fig. 15** zeigt die DNA-Stabilisierung und -Isolierung parallel zur RNA-Stabilisierung und -Isolierung. Dabei werden je 40 µl der Eluate in einem 0,8% Agarose-TBE-Gel aufgetrennt. Die jeweiligen Proben sind in Beispiel 15 beschrieben.

BeispieleBeispiel 1:

Stabilisierung der RNA in Blut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat (TTAOx) in verschiedenen Carbonsäure-Puffern mit unterschiedlichen pH-Werten

Als Additive werden Carbonsäuren verschiedener Kettenlänge ausgewählt. Außerdem werden Mono-, Di- und Tri-Carbonsäuren, hydroxylierte und nicht hydroxylierte Carbonsäuren getestet. Alle Substanzen werden zur Stabilisierung in Kombination mit der kationischen Verbindung Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat eingesetzt. Dabei werden sowohl der pH-Wert als auch die Konzentration der Substanzen variiert.

Fig. 1 zeigt die Ergebnisse der Untersuchungen. In allen Fällen kann auch nach 24 bzw. 48 h intakte RNA isoliert werden. Die z.T. geringen RNA Mengen hängen mit dem geringen Blutvolumen zusammen, das aufgearbeitet wurde und mit dem unterschiedlichen RNA Gehalt in verschiedenen Blutproben. Bei diesem Experimenten wurde ein Anteil der genomischen DNA ebenfalls in den RNA-Fraktionen erhalten.

500 µl Blut werden mit 500 µl eines Puffers, bestehend aus 10 % (w/v) Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, gepuffert mit unterschiedlichen Carbonsäuren jeweils in einer Konzentration von 200 mM, sowie den für die jeweilige Carbonsäure jeweils unerschiedlichen pH-Werten, für 24 und 48 Stunden bei RT gelagert. Zur Isolierung der RNA werden die Komplexe - bestehend aus kationischer Verbindung und Nukleinsäure - abzentrifugiert; das Pellet wird einmal mit Wasser gewaschen, erneut abzentrifugiert und in 300 µl eines handelsüblichen Lysepuffers - wie z. B. RLT Puffer der Firma QIAGEN - aufgenommen. Die Probe wird mit 360 µl Wasser verdünnt und für 10 Minuten bei 55°C mit 40 µl Proteinase K behandelt. Anschließend wird die Probe zentrifugiert, der Überstand mit Ethanol versetzt und auf eine Silica-Membran enthaltende Spin-Säule aufgetragen. Die Probe wird mittels Zentrifugation durch die Membran geführt. Die Spin-Säule wird einmal mit einem kommerziell erhältlichen Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen

Waschpuffer - beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Firma QIAGEN - und zweimal mit einem handelsüblichen, alkoholhaltigen Waschpuffer - z. B. Puffer RPE der Firma QIAGEN - gewaschen, und die RNA anschließend in 60 µl RNase freiem Wasser, das ebenfalls mittels Zentrifugation durch die Membran geführt wird, eluiert. Jeweils 30 µl des Eluates werden auf einem 1,2%-igen Agarose/Formaldehyd Gel aufgetrennt.

Beispiel 2:

Stabilisierung der RNA in Vollblut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und Weinsäure (gepuffert) bei pH 3 in unterschiedlichen Konzentrationen.

500 µl Blut werden mit 500 µl eines Puffers, bestehend aus 10 % (w/v) Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 50-500 mM Weinsäure pH 3 für 2,5, 24 und 48 Stunden bei RT gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgt wie in Fig. 1 beschrieben, mit dem Unterschied, dass zusätzlich die genomische DNA durch eine DNase Behandlung der Probe mit dem „RNase-Free-DNase Set“ der Firma QIAGEN entfernt wird. Die RNA wird mit 80 µl RNase freiem Wasser eluiert. Jeweils 30 µl des Eluates werden auf einem 1,2%-igen Agarose/Formaldehyd Gel aufgetrennt.

Beispiel 3:

Stabilisierung der RNA in Vollblut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gepuffert mit 250 mM Weinsäure bei pH 3.

Bestimmung der Integrität, Ausbeute und Reinheit der RNA:

Die RNA wird in Blut für mindestens 72 Stunden ohne Degradation oder einen Ausbeuteverlust in einer Lösung aus Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, gepuffert mit einem Carbonsäurepuffer, z. B. 250 mM Weinsäure pH 3,0 , stabilisiert (s. Fig. 3).

2 ml Blut werden mit 2 ml eines Puffers, bestehend aus 10 % (w/v) Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 250 mM Weinsäure pH 3,0 gemischt und für 24 -72 Stunden bei RT gelagert. Die Isolierung der RNA erfolgt wie in Beispiel 2 beschrieben, mit dem Unterschied, daß die Probe vor der Zentrifugation der Komplexe - bestehend aus der kationischen Verbindung und der Nukleinsäure - mit einem handelsüblichen Erythrocyten-Lysepuffer - wie z.B. dem Puffer EL der Fa. Qiagen GmbH - versetzt und danach 10 Minuten auf Eis inkubiert wird. Die RNA wird mit 80 µl RNase-freiem Wasser eluiert. Jeweils 30 µl des Eluates werden auf einem 1,2%-igen Agarose/Formaldehyd Gel aufgetrennt, bzw. in einem Spektralphotometer vermessen. Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird nach Verdünnung mit Wasser durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Reinheit der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm ermittelt.

#### Beispiel 4:

Stabilisierung der RNA in Vollblut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat unterschiedlicher Konzentrationen, gepuffert mit Weinsäure bei pH 4,0

#### Northern-Blot-Analyse

2,5 ml Blut werden mit 6,9 ml eines Puffers, bestehend aus 4 % Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM Weinsäure pH 3,7 gemischt und für 1 h, 24 h, 48 h und 72 h bei RT gelagert. Zur Isolierung der RNA werden die Komplexe aus kationischer Verbindung und Nukleinsäure abzentrifugiert. Das Pellet wird einmal mit Wasser gewaschen und dann in 300 µl Lysepuffer - beispielsweise Puffer RLT der Firma QIAGEN - aufgenommen. Die weitere Probenvorbereitung erfolgt wie in Fig. 2 beschrieben. Jeweils 2,5 µg total RNA werden anschließend auf einem 1,2 %-igen denaturierenden Agarose/Formaldehyd Gel aufgetrennt. Anschließend wird die RNA auf eine Nylonmembran übertragen und über einen Zeitraum von ca. 12 h, in einem Natriumphosphat/SDS Puffer, bei

68°C, mit einer radioaktiv markierten anti-sense RNA Sonde für das GAPDH-Gen (Fig. 4A), bzw. das IFN- $\gamma$ -Gen (Fig. 4B), hybridisiert. Die Membran wird mit Waschpuffern abnehmender Salzkonzentration von 2 x SSC/0,1 % SDS bis 0,1 x SSC/0,1 % SDS bei einer Temperatur von 68°C gewaschen. Die Nylonmembran wird anschließend auf einem Röntgenfilm exponiert. Sowohl das GAPDH- als auch das IFN- $\gamma$ -mRNA-Signal bleibt über einen Lagerungszeitraum von über 72 h konstant. Dieses Ergebnis belegt, dass ein Abbau der m-RNA über den genannten Zeitraum nicht stattgefunden hat.

Beispiel 5:

Stabilisierung der genomischen DNA in Blut mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gepuffert mit Weinsäure bei pH 3,7

Neben der zellulären RNA kann mit dem hier entwickelten Verfahren auch die genomische DNA aus Vollblut stabilisiert und anschließend durch Bindung an eine Silica-Membran isoliert werden. Fig. 5 zeigt, dass auch nach Lagerung für 72 h bei RT hochmolekulare DNA (Länge > 20 kB) isoliert wird.

2,5 ml Blut werden mit 6,9 ml einer Lösung bestehend aus 4 % (w/v) Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM Weinsäure bei pH 3,7 gemischt und für 24 bzw. 72 Stunden bei RT gelagert. Zur Isolierung der DNA werden die Komplexe aus kationischer Verbindung und DNA abzentrifugiert. Das Pellet wird in 300  $\mu$ l eines Natriumchlorid- und EDTA-haltigen Puffers aufgenommen, dann werden 360  $\mu$ l eines kommerziell erhältlichen Guanidinium Hydrochlorid Puffers - wie z. B. der Puffer AL der Firma QIAGEN - sowie 20  $\mu$ l Proteinase K zugegeben. Die Proben werden für 10 min bei 65°C inkubiert, dann werden 420  $\mu$ l Ethanol zugegeben und die Probe auf eine Silica-Membran enthaltende Spin-Säule aufgetragen. Die Probe wird mittels Zentrifugation durch die Membran geführt. Die Silica-Membran wird je einmal mit einem handelsüblichen ethanolhaltigen Guanidinium Hydrochlorid Puffer - wie z. B. der Puffer AW1 der Firma QIAGEN - und einmal mit einem Ethanol-haltigen Waschpuffer - wie z. B. der Puffer AW 2 der Firma QIAGEN - gewaschen. Die DNA wird mit 300  $\mu$ l eines Tris-Puffers (pH 8)

eluiert. Je 5 µl des Eluates werden auf einem 0,8 %-igen Agarose/TBE Gel aufgetrennt.

Beispiel 6:

Verwendung der genomischen DNA in enzymatischen Reaktionen.

Fig. 6 zeigt, dass die entsprechend Beispiel 5 isolierte DNA für verschiedene enzymatische Reaktionen (Restriktion und PCR-Amplifikation) einsetzbar ist.

Die nach Lagerung für 24 bzw. 72 Stunden isolierte DNA (siehe Beispiel 5) wird in verschiedenen enzymatischen Reaktionen eingesetzt. Dies ist ein Beweis für die hohe Reinheit gute Qualität der isolierten DNA.

A) Je 2 µg der DNA werden mit 6 U der Restriktionsenzyme EcoRI (E) bzw. Hind III (H) für 3 h bei 37°C geschnitten und anschließend auf einem 0,8 %-igen Agarose/TBE-Gel aufgetrennt. Zur Kontrolle ist jeweils die ungeschnittene DNA ausgetragen.

B) Jeweils 150 bzw. 300 ng der genomischen DNA werden in eine PCR Reaktion eingesetzt (Gesamtvolumen 50 µl), bei der ein 1,1 kB langes Fragment des hugl-Gens amplifiziert wird. Die PCR-Produkte werden auf einem 1,2 %-igen Agarose/TBE-Gel aufgetrennt.

Beispiel 7:

RNA-Stabilisierung in Plasma mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven

Diese Experimente demonstrieren, dass der Zusatz von Carbonsäuren und anderen Additiven zu Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat die Stabilisierung von

freier RNA in Plasma im Vergleich zu RNA-Stabilisierung nur mit Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat deutlich verbessert.

Zur Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Lösungen wird eine Stammlösung von 30% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit jeweils einer Stammlösung von 0,5 M von Weinsäure, Zitronensäure, Tartronsäure, Bernsteinsäure, Ammoniumsulfat oder Phosphorsäure zu einer Endkonzentration von 2% oder 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM des Additivs vermischt. Die Stammlösungen der Additive werden vor der Mischung mit Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mittels Natronlauge auf den angegebenen pH-Wert eingestellt. Als Kontrolle wird eine 5% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat-Lösung ohne Additiv-Zusatz verwendet.

Je 0,5 ml einer jeden so erzeugten Lösung wird in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt. 15 µg Gesamt-RNA aus Hela-Zellen, die zuvor z. B. mittels eines kommerziell erhältlichen RNA-Isolierungskits (z. B. RNA-Isolierungskit RNeasy® Maxi-Kits der Firma QIAGEN) isoliert wird, wird in den Deckel des Eppendorf-Gefäßes pipettiert. 0,5 ml menschliches Blutplasma wird zur Lösung gegeben, der Deckel des Gefäßes geschlossen und das Gefäß zur Mischung der Flüssigkeiten fünf Mal rasch invertiert. Die Proben werden 1 Tag bei RT (ca. 20 bis 25°C) gelagert. Alle Experimente werden in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zur Isolierung der RNA werden die Proben über einen Zeitraum von 3 min mit 25000xg zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und 0,5 ml eines auf 60°C temperierten Puffers, der Guanidinium-Hydrochlorid und Nonidet P40 pH 7,0 enthält, sowie Proteinase K werden auf das Pellet gegeben. Das Pellet wird durch Vortexen gelöst und 15 min lang bei 50°C inkubiert. Anschließend wird 0,5 ml einer Ethanol-Nonidet P40-Lösung zugegeben und die Probe durch Vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s gemischt. Die Probe wird anschließend in eine handelsübliche Silicamembran enthaltene Spin-Säule, - wie z. B. QIAamp-Säulen der Firma QIAGEN - aufgetragen und durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran hindurchgeföhrt. Die RNA bleibt an der Membran gebunden und wird anschließend zweimal mit einem alkoholhaltigen Waschpuffer, z. B. Puffer AW2 der Firma QIAGEN, gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch

Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran geführt. Im Anschluß an die Waschung mit dem alkoholhaltigen Waschpuffer wird die Membran ohne Pufferzugabe durch eine Zentrifugation (3 min max. rpm, hier 25000xg) getrocknet. Zur Elution werden 30 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran abzulösen. Das Eluat wird durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran geführt und der Elutionsschritt wird zum Zwecke einer vollständigen Elution noch einmal wiederholt.

Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 1,0 %-ige Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gele angefertigt. Es werden jeweils 30 µl des Eluates eingesetzt. Das Ergebnis ist in Fig. 7 wiedergegeben. Die Beladung der Gelspuren ist in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2: Zusammenfassung der in Fig. 7 dargestellten Proben.

Proben Nr.	Endkonzentration an Tetradecyltrimethylammonium- Oxalat	Additiv
1,2	4%	Zitronensäure pH 4
3,4	4%	Zitronensäure pH 5
5,6	4%	Zitronensäure pH 6
7,8	4%	Weinsäure pH 3
9,10	4%	Weinsäure pH 4
11,12	4%	Bernsteinsäure pH 4
13,14	4%	Tartronsäure pH 3
15,16	4%	Tartronsäure pH 4
17,18	4%	Phosphorsäure pH 3
19,20	4%	Phosphorsäure pH 4
21,22	4%	Phosphorsäure pH 5
23,24	2%	Zitronensäure pH 3
25,26	2%	Zitronensäure pH 4
27,28	2%	Weinsäure pH 3

29,30	2%	Weinsäure pH 4
31,32	2%	Bernsteinsäure pH 4
33,34	2%	Phosphorsäure pH 2
35,36	2%	Phosphorsäure pH 3
37,38	2%	Phosphorsäure pH 4
39,40	2%	Phosphorsäure pH 5
41,42	4%	Ammoniumsulfat pH 2
43,44	5%	-

Spur 45 enthält zum Vergleich der RNA-Qualität der einzelnen Proben 3,75 µg der für diese Versuche eingesetzten Gesamt-RNA aus Hela-Zellen.

Die geelektrophoretische Auftrennung der für dieses Experiment eingesetzten Hela-Gesamt-RNA zeigt nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die intakte 28S und 18S rRNA. Die obere der sichtbaren rRNA-Banden (28S rRNA) ist dabei deutlich intensiver und dicker als die untere rRNA-Bande (18S rRNA), was ein typisches Merkmal intakter, nicht abgebauter RNA darstellt. Der Vergleich der eintägig in mit 5% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat ohne Additiv-Zusatz vermischttem Plasma gelagerten Hela-Gesamt-RNA mit der RNA, die nach eintägiger Lagerung aus in mit Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und verschiedenen Additiven vermischtem Plasma isoliert wird, zeigt deutlich, dass der Zusatz von Additiven die RNA-Stabilisierung verbessert. Wird RNA ohne Zusatz einer stabilisierenden Verbindung zu Plasma gegeben, führt dies bekannterweise zu einem vollständigen RNA-Abbau binnen weniger Minuten.

Beispiel 8:

RNA-Stabilisierung in Plasma mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat  
gemischt mit Wein- bzw. Tartronsäure über verschiedene Zeiträume

Diese Experimente zeigen, dass die RNA durch Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat-Additiv-Mischungen in Plasma bis zu mindestens 14 Tagen stabilisiert wird.

Zur Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Lösungen wird eine Stammlösung von 30% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit jeweils einer Stammlösung von 0,5 M von Weinsäure pH 3 oder Tartronsäure pH 3 zu einer Endkonzentration von 6% oder 8% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM des Additivs vermischt.

Je 0,5 ml einer jeden so erzeugten Lösung wird in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt. 15 µg Gesamt-RNA aus Hela-Zellen, die zuvor mittels eines kommerziell erhältlichen RNA-Isolierungskits - wie z. B. RNeasy® Maxi-Kits der Firma QIAGEN - isoliert wird, wird in den Deckel des Eppendorf-Gefäßes pipettiert. 0,5 ml menschliches Blut-Plasma wird zur Lösung gegeben, der Deckel des Gefäßes geschlossen und das Gefäß zur Mischung der Flüssigkeiten fünf Mal rasch invertiert. Die Proben werden 3, 7, 10 und 14 Tage bei RT (ca. 20 bis 25°C) gelagert. Alle Experimente werden in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die RNA-Isolierung erfolgt wie in Beispiel 7 beschrieben.

Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 1,0 %-ige Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gele angefertigt. Es werden jeweils 30 µl des Eluates eingesetzt. Das Ergebnis ist in Fig. 8 wiedergegeben. Die Beladung der Gelpuren ist in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Zusammenfassung der in Fig. 8 dargestellten Proben.

Proben Nr.	Konzentration Tetradecyl- trimethylammoniumoxalat im Puffer	Additiv	Lagerungs- dauer
1,2	6%	Weinsäure pH 3	3 Tage
3,4	8%	Weinsäure pH 3	3 Tage
5,6	6%	Tartronsäure pH 3	3 Tage
7,8	8%	Tartronsäure pH 3	3 Tage
9,10	6%	Weinsäure pH 3	7 Tage
11,12	8%	Weinsäure pH 3	7 Tage
13,14	6%	Tartronsäure pH 3	7 Tage
15,16	8%	Tartronsäure pH 3	7 Tage
17,18	6%	Weinsäure pH 3	10 Tage
19,20	8%	Weinsäure pH 3	10 Tage
21,22	6%	Tartronsäure pH 3	10 Tage
23,24	8%	Tartronsäure pH 3	10 Tage
25,26	6%	Weinsäure pH 3	14 Tage
27,28	8%	Weinsäure pH 3	14 Tage
29,30	6%	Tartronsäure pH 3	14 Tage
31,32	8%	Tartronsäure pH 3	14 Tage

Spur "K" enthält zum Vergleich der RNA-Qualität der einzelnen Proben 3,75 µg der für diese Versuche eingesetzten Gesamt-RNA aus Hela-Zellen.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der zeigt nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die intakte 28S und 18S rRNA\_banden, auch nach bis zu 14-tägiger Lagerung der Hela-Gesamt-RNA in Plasma, das mit Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und Weinsäure bzw. Tartronsäure pH 3 vermischt wurde.

Beispiel 9:

RNA-Stabilisierung in 1 ml Plasma mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat  
gemischt mit verschiedenen Additiven

Diese Experimente zeigen, dass die RNA durch Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat-Additiv-Mischungen auch in einem größeren Plasmavolumen möglich ist.

Zur Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Lösungen wird eine Stammlösung von 30% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit jeweils einer Stammlösung von 0,5 M von Weinsäure, bei pH 3 oder pH 4, Tartronsäure bei pH 3 oder pH 4 oder von Phosphorsäure bei pH 3 oder pH 4 zu einer Endkonzentration von 4 % Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM des Additivs vermischt.

Je 1 ml einer jeden so erzeugten Lösung wird in ein 2 ml Eppendorf-Gefäß vorgelegt. 15 µg Gesamt-RNA aus Hela-Zellen, die zuvor z. B. mittels des RNA-Isolierungskits RNeasy® Maxi-Kits der Firma QIAGEN isoliert wird, wird in den Deckel des Eppendorf-Gefäßes pipettiert. 1 ml menschliches Blut-Plasma wird zur Lösung gegeben, der Deckel des Gefäßes geschlossen und das Gefäß zur Mischung der Flüssigkeiten fünf Mal rasch invertiert. Die Proben werden 3 Tage bei RT (ca. 20 bis 25°C) gelagert. Alle Experimente werden in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die RNA-Isolierung erfolgt wie in Beispiel 7 beschrieben.

Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 1,0 %-ige Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gele angefertigt. Es werden jeweils 30 µl des Eluates eingesetzt. Das Ergebnis ist in Fig. 9 wiedergegeben. Die Beladung der Gelspuren ist in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Zusammenfassung der in Fig. 9 dargestellten Proben

Proben Nr	Additiv
1,2	Weinsäure pH 3
3,4	Weinsäure pH 4
5,6	Phosphorsäure pH 3
7,8	Phosphorsäure pH 4
9,10	Tartronsäure pH 3
11,12	Tartronsäure pH 4

Spur 13 enthält zum Vergleich der RNA-Qualität der einzelnen Proben 3,75 µg der für diese Versuche eingesetzten Gesamt-RNA aus Hela-Zellen.

Die gelelektrophoretische Auftrennung der zeigt nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die intakte 28S und 18S rRNA-Banden. Die RNA wird somit auch in einem größeren Plasmavolumen durch die Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat-Additiv-Mischung stabilisiert.

#### Beispiel 10:

**RNA-Stabilisierung in Hela-Zellen mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven**

Diese Experimente demonstrieren, dass Mischungen aus Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit verschiedenen Additiven die Stabilisierung von RNA in Hela-Zellen über eine Lagerungsdauer von bis zu 14 Tagen bei RT ermöglichen.

Zur Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Lösungen wird eine Stammlösung von 20 % oder 30% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit jeweils einer Stammlösung von 0,5 M von Weinsäure, Zitronensäure, Tartronsäure, Ammoniumsulfat oder Phosphorsäure zu einer Endkonzentration von 2 % oder 4 %

Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM des Additivs vermischt. Die Stammlösungen der Additive werden vor der Mischung mit Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mittels Natronlauge bzw. Schwefelsäure auf den angegebenen pH-Wert eingestellt.

Je  $1 \times 10^6$  HeLa-Zellen, die direkt zuvor aus der Zellkultur geerntet und mit PBS gewaschen werden, werden durch Zentrifugation (1 min bei 120 xg) pelletiert und der Überstand entfernt. Zu den Zellen werden jeweils 300 µl der in Tabelle 4 genannten Lösungen gegeben und die Proben durch Vortexen gemischt und dabei die Zellen re-suspendiert. Die Proben werden 3, 7, 10 und 14 Tage bei RT (ca. 20 bis 25°C) gelagert. Alle Experimente werden in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt.

Zur RNA-Isolierung werden die Zellen durch dreiminütige Zentrifugation bei 1200 xgpelletiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird in 600 µl eines handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-Puffers - wie z. B. RLT-Puffer der Firma QIAGEN - durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über einen Zeitraum von ca. 10 s oder länger re-suspendiert. Anschließend wird 1 Volumen (600 µl) 70 %-iges Ethanol zugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s gemischt. Das Lysat wird anschließend in eine handelsübliche Silicamembran enthaltene Spinsäule - wie z. B. RNeasy-Säulen der Firma QIAGEN - aufgetragen und durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran hindurchgeföhrt. Die RNA bleibt an der Membran gebunden und wird anschließend mit einem ersten handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Waschpuffer - beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Firma QIAGEN - und danach mit einem zweiten alkoholhaltigen Waschpuffer, z. B. Puffer RPE der Firma QIAGEN, gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran geföhrt. Die Waschung mit dem zweiten alkoholhaltigen Waschpuffer wird mit einem geringeren Volumen wiederholt wobei gleichzeitig die Membran durch die Zentrifugation (2 min max. rpm, hier 20000xg) getrocknet wird. Zur Elution werden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran abzulösen. Durch Zentrifugation (1 min bei 10000

34

xg) wird das Eluat durch die Membran hindurchgeführt und der Elutionsschritt wird zum Zwecke einer vollständigen Elution noch einmal wiederholt.

Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 1,0 %-ige Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gele angefertigt. Es werden jeweils 20 µl des Eluates eingesetzt. Das Ergebnis ist in Fig. 10 wiedergegeben. Die Proben sind in Tabelle 5 zusammengefaßt, wobei alle Proben jeweils 2x durchgeführt und dargestellt worden sind mit Ausnahme der Proben 14, 40, 66 und 92 die 1x durchgeführt und dargestellt worden sind.

Tabelle 5: Zusammenfassung der in Fig. 10 dargestellten Proben

Prob en Nr.	Endkonzentration an Tetradecyltrimethy l-ammonium- Oxalat	Additiv	finaler pH-Wert der Mischung aus Tetradecyltrimethyl- ammonium-Oxalat und Additiv ca.	Lager- dauer
1	4%	Weinsäure pH 3	3,4	3 Tage
2	4%	Weinsäure pH 4	4,3	3 Tage
3	4%	Weinsäure pH 5	5,3	3 Tage
4	4%	Weinsäure pH 6	6,0	3 Tage
5	4%	Weinsäure pH 7	7,3	3 Tage
6	4%	Phosphorsäure pH 3	4,3	3 Tage
7	4%	Phosphorsäure pH 4	4,9	3 Tage
8	4%	Phosphorsäure pH 5	6,0	3 Tage
9	4%	Phosphorsäure pH 6	6,3	3 Tage
10	4%	Phosphorsäure pH 7	7,1	3 Tage

11	4%	Ammoniumsulfat pH 2	4,1	3 Tage
12	4%	Ammoniumsulfat pH 3	5,2	3 Tage
13	4%	Ammoniumsulfat pH 4	6,0	3 Tage
14	4%	Ammoniumsulfat pH 5	6,1	3 Tage
15	4%	Zitronensäure pH 3	3,3	3 Tage
16	4%	Zitronensäure pH 4	4,3	3 Tage
17	4%	Zitronensäure pH 5	5,4	3 Tage
18	4%	Zitronensäure pH 6	6,3	3 Tage
19	4%	Zitronensäure pH 7	7,5	3 Tage
20	4%	Tartronsäure pH 3	3,6	3 Tage
21	4%	Tartronsäure pH 4	4,4	3 Tage
22	4%	Tartronsäure pH 5	5,3	3 Tage
23	4%	Tartronsäure pH 6	5,9	3 Tage
24	4%	Tartronsäure pH 7	7,3	3 Tage
25	2%	Weinsäure pH 3	nb	3 Tage
26	2%	Weinsäure pH 6	nb	3 Tage
27	4%	Weinsäure pH 3	3,4	7 Tage
28	4%	Weinsäure pH 4	4,3	7 Tage
29	4%	Weinsäure pH 5	5,3	7 Tage
30	4%	Weinsäure pH 6	6,0	7 Tage
31	4%	Weinsäure pH 7	7,3	7 Tage
32	4%	Phosphorsäure pH 3	4,3	7 Tage
33	4%	Phosphorsäure pH 4	4,9	7 Tage
34	4%	Phosphorsäure pH 5	6,0	7 Tage

35	4%	Phosphorsäure pH 6	6,3	7 Tage
36	4%	Phosphorsäure pH 7	7,1	7 Tage
37	4%	Ammoniumsulfat pH 2	4,1	7 Tage
38	4%	Ammoniumsulfat pH 3	5,2	7 Tage
39	4%	Ammoniumsulfat pH 4	6,0	7 Tage
40	4%	Ammoniumsulfat pH 5	6,1	7 Tage
41	4%	Zitronensäure pH 3	3,3	7 Tage
42	4%	Zitronensäure pH 4	4,3	7 Tage
43	4%	Zitronensäure pH 5	5,4	7 Tage
44	4%	Zitronensäure pH 6	6,3	7 Tage
45	4%	Zitronensäure pH 7	7,5	7 Tage
46	4%	Tartronsäure pH 3	3,6	7 Tage
47	4%	Tartronsäure pH 4	4,4	7 Tage
48	4%	Tartronsäure pH 5	5,3	7 Tage
49	4%	Tartronsäure pH 6	5,9	7 Tage
50	4%	Tartronsäure pH 7	7,3	7 Tage
51	2%	Weinsäure pH 3	nb	7 Tage
52	2%	Weinsäure pH 6	nb	7 Tage
53	4%	Weinsäure pH 3	3,4	10 Tage
54	4%	Weinsäure pH 4	4,3	10 Tage
55	4%	Weinsäure pH 5	5,3	10 Tage
56	4%	Weinsäure pH 6	6,0	10 Tage
57	4%	Weinsäure pH 7	7,3	10 Tage
58	4%	Phosphorsäure pH 3	4,3	10 Tage
59	4%	Phosphorsäure pH 4	4,9	10 Tage

60	4%	Phosphorsäure pH 5	6,0	10 Tage
61	4%	Phosphorsäure pH 6	6,3	10 Tage
62	4%	Phosphorsäure pH 7	7,1	10 Tage
63	4%	Ammoniumsulfat pH 2	4,1	10 Tage
64	4%	Ammoniumsulfat pH 3	5,2	10 Tage
65	4%	Ammoniumsulfat pH 4	6,0	10 Tage
66	4%	Ammoniumsulfat pH 5	6,1	10 Tage
67	4%	Zitronensäure pH 3	3,3	10 Tage
68	4%	Zitronensäure pH 4	4,3	10 Tage
69	4%	Zitronensäure pH 5	5,4	10 Tage
70	4%	Zitronensäure pH 6	6,3	10 Tage
71	4%	Zitronensäure pH 7	7,5	10 Tage
72	4%	Tartronsäure pH 3	3,6	10 Tage
73	4%	Tartronsäure pH 4	4,4	10 Tage
74	4%	Tartronsäure pH 5	5,3	10 Tage
75	4%	Tartronsäure pH 6	5,9	10 Tage
76	4%	Tartronsäure pH 7	7,3	10 Tage
77	2%	Weinsäure pH 3	nb	10 Tage
78	2%	Weinsäure pH 6	nb	10 Tage
79	4%	Weinsäure pH 3	3,4	14 Tage
80	4%	Weinsäure pH 4	4,3	14 Tage
81	4%	Weinsäure pH 5	5,3	14 Tage
82	4%	Weinsäure pH 6	6,0	14 Tage
83	4%	Weinsäure pH 7	7,3	14 Tage
84	4%	Phosphorsäure pH 3	4,3	14 Tage

85	4%	Phosphorsäure pH 4	4,9	14 Tage
86	4%	Phosphorsäure pH 5	6,0	14 Tage
87	4%	Phosphorsäure pH 6	6,3	14 Tage
88	4%	Phosphorsäure pH 7	7,1	14 Tage
89	4%	Ammoniumsulfat pH 2	4,1	14 Tage
90	4%	Ammoniumsulfat pH 3	5,2	14 Tage
91	4%	Ammoniumsulfat pH 4	6,0	14 Tage
92	4%	Ammoniumsulfat pH 5	6,1	14 Tage
93	4%	Zitronensäure pH 3	3,3	14 Tage
94	4%	Zitronensäure pH 4	4,3	14 Tage
95	4%	Zitronensäure pH 5	5,4	14 Tage
96	4%	Zitronensäure pH 6	6,3	14 Tage
97	4%	Zitronensäure pH 7	7,5	14 Tage
98	4%	Tartronsäure pH 3	3,6	14 Tage
99	4%	Tartronsäure pH 4	4,4	14 Tage
100	4%	Tartronsäure pH 5	5,3	14 Tage
101	4%	Tartronsäure pH 6	5,9	14 Tage
102	4%	Tartronsäure pH 7	7,3	14 Tage
103	2%	Weinsäure pH 3	nb	14 Tage
104	2%	Weinsäure pH 6	nb	14 Tage

Die Proben "K" zeigen eine Gesamt-RNA, die ohne vorherige Lagerung mit Hilfe eines Isolierungs Kits - wie z. B. dem RNeasy® Mini Kits der Firma QIAGEN - aus je  $1 \times 10^6$  Hela-Zellen isoliert wird (= Positiv-Kontrolle). Die Proben "a", "b", "c" und "d"

zeigen eine Gesamt-RNA, die nach 3, 7, 10 bzw. 14 Tagen Lagerung von je  $1 \times 10^6$  Hela-Zellen in PBS - ohne Zuätze - wie oben beschrieben isoliert wird.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird nach Verdünnung in Wasser durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Reinheit der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt. Die Ergebnisse der Isolierungen sind in der nachfolgenden Tabelle 6 dargestellt. Es werden jeweils die Mittelwerte der Doppelbestimmung angegeben.

Tabelle 6: RNA-Ausbeute der nach Beispiel 10 aus in Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven gelagerten Hela-Zellen isolierten Gesamt-RNA

Additiv	Lagerungsdauer (Tage)	RNA-Ausbeute (µg)	$E_{260}/E_{280}$
Weinsäure pH 5	3	28,7	1,84
Weinsäure pH 5	7	30,7	1,86
Weinsäure pH 5	10	33,4	1,90
Weinsäure pH 5	14	56,4	1,94
Weinsäure pH 6	3	38,4	1,92
Weinsäure pH 6	7	55,5	2,0
Weinsäure pH 6	10	36,1	1,93
Weinsäure pH 6	14	36,9	1,94
Phosphorsäure pH 5	3	39,5	1,89
Phosphorsäure pH 5	7	27,1	1,91
Phosphorsäure pH 5	10	36,9	1,89
Phosphorsäure pH 5	14	40,2	1,85
Phosphorsäure pH 6	3	25,6	1,98
Phosphorsäure pH 6	7	29,2	1,89
Phosphorsäure pH 6	10	34,2	1,88
Phosphorsäure pH 6	14	40,9	1,95
Tartronsäure pH 5	3	24,7	1,95

Tartronsäure pH 5	7	30,8	1,91
Tartronsäure pH 5	10	30,4	1,90
Tartronsäure pH 5	14	30,8	1,95
Tartronsäure pH 6	3	30,6	1,96
Tartronsäure pH 6	7	31,0	1,90
Tartronsäure pH 6	10	34,0	1,95
Tartronsäure pH 6	14	32,0	1,92
Ammoniumsulfat pH 5	3	31,5	1,98
Ammoniumsulfat pH 5	7	27,1	1,88
Ammoniumsulfat pH 5	10	35,7	1,93
Ammoniumsulfat pH 5	14	35,5	1,92
Zitronensäure pH 6	3	24,4	1,91
Zitronensäure pH 6	7	31,5	1,94
Zitronensäure pH 6	10	32,5	1,94
Zitronensäure pH 6	14	39,2	1,94
Positiv-Kontrolle	0	33,2	1,90

Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die intakte 28S und 18S rRNA-Banden in den Positiv-Kontrollen. Die obere der rRNA-Banden (28S rRNA) ist dabei deutlich intensiver und dicker als die untere rRNA-Bande (18S rRNA), was ein typisches Merkmal intakter, nicht abgebauter RNA darstellt. Nach 3-tägiger Lagerung der Zellen in PBS ist die RNA z. T. abgebaut, da die beiden rRNA-Banden gleiche Intensität zeigen und deutlich weniger RNA sichtbar ist. Nach 7-tägiger oder längerer Lagerung ist keine RNA mehr sichtbar. Im Gegensatz dazu wird die RNA in Hela-Zellen durch Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven bis zu 14 Tagen stabilisiert. Dies wird durch die OD-Messung bestimmte RNA-Ausbeute und -Reinheit bestätigt. Die Stabilisierung wird vom pH-Wert beeinflußt. Dabei sind finale pH-Werte in der Mischung, d. h. nach Mischung von Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und Additiv definierten pH-Wertes, von größer 4 bevorzugt.

Beispiel 11:

41

**RNA-Stabilisierung in unterschiedlichen Mengen von Hela-Zellen**

Diese Experimente zeigen, dass die Stabilisierung von RNA in Hela-Zellen mittels Mischungen von Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit Additiven unabhängig von der Anzahl der eingesetzten Zellen erfolgt.

Zur Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Lösung wird eine Stammlösung von 20% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit einer Stammlösung von 0,5 M Weinsäure bei pH 6 zu einer Endkonzentration von 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM des Additivs vermischt. Die Stammlösung des Additivs wird vor der Mischung mit Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mittels Natronlauge auf den angegebenen pH-Wert eingestellt.

Je  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  Hela-Zellen, die direkt zuvor aus der Zellkultur geerntet und mit PBS gewaschen werden, werden durch Zentrifugation (1 min bei 120 xg) pelletiert und der Überstand entfernt. Zu den Zellen wird jeweils 300 µl Lösung mit 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM Weinsäure gegeben und die Proben durch Vortexen gemischt und dabei die Zellen resuspendiert. Die Proben werden 15 min bzw. 1 Tag bei RT (ca. 20 bis 25°C) gelagert. Alle Experimente werden in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die RNA-Isolierung erfolgt wie in Beispiel 10 beschrieben.

Als Kontrollen werden je  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$  und  $5 \times 10^6$  Hela-Zellen ohne vorherige Behandlung mit 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Weinsäure und ohne Lagerung zur RNA-Isolierung wie oben beschrieben eingesetzt.

Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 1,0 %-ige Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gele angefertigt. Es werden jeweils 20 µl des Eluates eingesetzt. Das Ergebnis ist

in Fig. 11 wiedergegeben. Die Proben sind in Tabelle 7 zusammengefaßt, wobei alle Proben jeweils 2x durchgeführt und dargestellt worden sind.

Tabelle 7: Zusammenfassung der in Fig. 11 dargestellten Proben

Proben Nr.	Zellanzahl	Lagerung
1,2	$1 \times 10^5$	-
3,4	$1 \times 10^5$	15 min
5,6	$1 \times 10^5$	1 Tag
7,8	$5 \times 10^5$	-
9,10	$5 \times 10^5$	15 min
11,12	$5 \times 10^5$	1 Tag
13,14	$1 \times 10^6$	-
15,16	$1 \times 10^6$	15 min
17,18	$1 \times 10^6$	1 Tag
19,20	$5 \times 10^6$	-
21,22	$5 \times 10^6$	15 min
23,24	$5 \times 10^6$	1 Tag

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird nach Verdünnung in Wasser durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Reinheit der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt. Die Ergebnisse der Isolierungen sind in der nachfolgenden Tabelle 8 dargestellt. Es werden jeweils die Mittelwerte der Doppelbestimmung angegeben.

Tabelle 8: RNA-Ausbeute der nach Beispiel 11 aus in 4% Tetradecyl-trimethylammonium-Oxalat, 200 mM Weinsäure gelagerten Hela-Zellen isolierten Gesamt-RNA

Zellzahl	Lagerung	RNA-Ausbeute (µg)	$E_{260}/E_{280}$
$1 \times 10^5$	-	3,0	2,04

		43	
$1 \times 10^5$	15 min	3,1	1,92
$1 \times 10^5$	1 Tag	3,5	1,97
$5 \times 10^5$	-	16,2	1,83
$5 \times 10^5$	15 min	15,2	1,85
$5 \times 10^5$	1 Tag	16,0	1,86
$1 \times 10^6$	-	28,2	1,75
$1 \times 10^6$	15 min	28,2	1,73
$1 \times 10^6$	1 Tag	34,4	1,77
$5 \times 10^6$	-	107,3	1,64
$5 \times 10^6$	15 min	91,3	1,61
$5 \times 10^6$	1 Tag	122,6	1,61

Die gelelektrophoretische Auf trennung zeigt nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die intakte 28S und 18S rRNA-Banden in den gelagerten ebenso wie in den nicht gelagerten Kontrollproben. Dabei ist kein Unterschied zwischen den nicht-gelagerten Kontrollen und den gelagerten Proben zu erkennen. Ebenso bestätigt die durch OD-Messung bestimmte RNA-Ausbeute und -Reinheit, dass die RNA-Stabilisierung in verschiedenen Zellmengen gleichermaßen erfolgt, ohne Verringerung der RNA-Ausbeuten oder RNA-Reinheit. Die mit zunehmender Zellzahl abnehmenden  $E_{260}/E_{280}$ -Quotienten sind darauf zurückzuführen, dass diese Messungen in Wasser und nicht in einem gepufferten System durchgeführt wurden.

#### Beispiel 12:

##### RNA-Stabilisierung in Macrophagen

Diese Experimente demonstrieren, dass RNA in verschiedenen Zelltypen eingesetzt werden kann. Die in diesem Experiment eingesetzten Macrophagen enthalten mehr RNasen als die zuvor verwendeten Hela-Zellen, wodurch der Abbau von RNA in den Zellen forcierter wird.

Zur Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Lösungen wird eine Stammlösung von 20% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit einer Stammlösung von 0,5 M Weinsäure pH 5, 0,5 M Tartronsäure pH 5 oder 0,5 M Phosphorsäure pH 5 zu einer Endkonzentration von 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM des Additivs vermischt. Die Stammlösung des Additivs wird vor der Mischung mit Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mittels Natronlauge auf den angegebenen pH-Wert eingestellt.

Je  $1 \times 10^6$  Hela-Zellen, die direkt zuvor aus der Zellkultur geerntet und mit PBS gewaschen werden, werden durch Zentrifugation (1 min bei 120 xg) pelletiert und der Überstand entfernt. Zu den Zellen wird jeweils 300 µl Lösung mit 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM Additiv gegeben und die Proben durch Vortexen gemischt und dabei die Zellen resuspendiert. Die Proben werden 2 Tage, 6 Tage, 9 Tage bzw. 14 Tage bei RT (ca. 20 bis 25°C) gelagert. Alle Experimente werden in Form von Doppelbestimmungen durchgeführt.

Die RNA-Isolierung erfolgt wie in Beispiel 10 beschrieben.

Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 1,0 %-ige Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gele angefertigt. Es werden jeweils 20 µl des Eluates eingesetzt. Das Ergebnis ist in Fig. 12 wiedergegeben. Die Proben sind in Tabelle 9 zusammengefaßt, wobei alle Proben jeweils 2x durchgeführt und dargestellt worden sind.

Tabelle 9: Zusammenfassung der in Fig. 12 dargestellten Proben

Proben Nr	Additiv	Lagerung
1,2	200 mM Phosphorsäure pH 5	2 Tage
3,4	200 mM Phosphorsäure pH 5	6 Tage
5,6	200 mM Phosphorsäure pH 5	9 Tage
7,8	200 mM Phosphorsäure pH 5	14 Tage
9,10	200 mM Tartronsäure pH 5	2 Tage
11,12	200 mM Tartronsäure pH 5	6 Tage

13,14	200 mM Tartronsäure pH 5	45	9 Tage
15,16	200 mM Tartronsäure pH 5		14 Tage
17,18	200 mM Weinsäure pH 5		2 Tage
19,20	200 mM Weinsäure pH 5		6 Tage
21,22	200 mM Weinsäure pH 5		9 Tage
23,24	200 mM Weinsäure pH 5		14 Tage

Die Spuren 25 und 26 zeigen eine Gesamt-RNA, die ohne vorherige Lagerung der Macrophagen mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Isolierungskits - wie z. B. RNeasy® Mini Kits der Firma QIAGEN - aus je  $1 \times 10^6$  Macrophagen isoliert wird (= Positiv-Kontrolle).

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird nach Verdünnung in Wasser durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Reinheit der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt. Die Ergebnisse der Isolierungen sind in der nachfolgenden Tabelle 10 dargestellt. Es werden jeweils die Mittelwerte der Doppelbestimmung angegeben.

Tabelle 10: Nukleinsäure-Ausbeute aus den nach Beispiel 12 in 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Additiv gelagerten Macrophagen

Additiv	Lagerung	RNA-Ausbeute (µg)	$E_{260}/E_{280}$
200 mM Phosphorsäure pH 5	2 Tage	24,2	1,91
200 mM Phosphorsäure pH 5	6 Tage	25,7	1,86
200 mM Phosphorsäure pH 5	9 Tage	21,6	1,83
200 mM Phosphorsäure pH 5	14 Tage	23,5	1,83
200 mM Tartronsäure pH 5	2 Tage	241	1,86

200 mM Tartronsäure pH 5	6 Tage	23,2	1,85
200 mM Tartronsäure pH 5	9 Tage	20,2	1,86
200 mM Tartronsäure pH 5	14 Tage	27,8	1,81
200 mM Weinsäure pH 5	2 Tage	25,4	1,85
200 mM Weinsäure pH 5	6 Tage	30,9	1,84
200 mM Weinsäure pH 5	9 Tage	24,3	1,86
200 mM Weinsäure pH 5	14 Tage	25,1	1,86
Positiv-Kontrolle	ohne Lagerung	16,3	1,88

Die gelelektrophoretische Auftrennung zeigt nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die intakte 28S und 18S rRNA-Banden in den gelagerten ebenso wie in den nicht gelagerten Proben, wobei auch noch 14-tägiger Lagerung kein RNA-Abbau zu erkennen ist. Ebenso bleiben die mittels photometrischer Messung bestimmten RNA-Ausbeuten und RNA-Reinheiten während der Lagerung unverändert.

### Beispiel 13:

#### RNA-Stabilisierung in adhärenten Hela-Zellen ohne Entfernung des Mediums

Diese Experimente zeigen, dass mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat-Additiv-Mischungen RNA auch in adhärenten Zellen stabilisiert werden kann. Die Stabilisierung erfolgt dabei auch, wenn das Medium in dem sich die Zellen befinden, nicht entfernt, sondern die Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat/Additiv-Mischung zum Medium hinzugegeben wird. Zellen in Medium können dabei als Modell für Zellen in Körperflüssigkeiten angesehen werden.

Zur Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Lösungen werden Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und das jeweilige Additiv Weinsäure bzw. Ammoniumsulfat für eine Endkonzentration von 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM Additiv eingewogen und in Wasser gelöst. Der pH-Wert der Lösung wird im Falle von 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Weinsäure mit Natronlauge und im Falle von 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Ammoniumsulfat mit Schwefelsäure auf pH 5 eingestellt.

Hela-Zellen werden in 6-well plates in je 2 ml Medium angezogen. Die Zellen wachsen adhärent, d. h. haften auf dem Boden des wells. Zur RNA-Stabilisierung in den Zellen werden zu je einem well jeweils 10 ml 4%

Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Weinsäure pH 5 bzw. 4%

Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Ammoniumsulfat pH 5 zugegeben und die Platten für 4 Tage bei RT gelagert. Als Negativ-Kontrolle wird ein well mit Medium aber ohne Zugabe einer 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Additiv-Mischung für 4 Tage bei RT gelagert.

Als Positiv-Kontrolle wird von einem well die RNA der Hela-Zellen ohne vorherige Lagerung mit Hilfe eines handelsüblichen Isolierungskits - wie z. B. RNeasy® Mini Kits der Firma QIAGEN - isoliert. Hierfür wird das Medium vollständig von den Zellen abgenommen und mit 350 µl des Lysepuffers RLT (Bestandteil des RNeasy-Kits) versetzt. Die Zellen werden mit einem Schaber vom Boden des wells abgeschabt und das Lysat in einen sog. Shredder - wie z. B. der QIAshredder der Firma QIAGEN - überführt. Durch Zentrifugation für 2 min bei 14000 rpm wird das Lysat durch den Shredder geführt und so die Probe homogenisiert. Der Durchfluß wird mit 70% Ethanol vermischt und wie in Beispiel 10 beschrieben, wird die RNA isoliert.

Nach 4 Tagen Lagerung der Zellen in einem Medium gemischt mit 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Additiv werden die nun abgelösten Zellen vollständig zusammen mit dem Überstand aufgenommen und 5 min bei 3000xg zentrifugiert. Die Überstände werden abgenommen und das Zellpellet zur RNA-Isolierung, wie in Beispiel 10, beschrieben verwendet.

Nach 4 Tagen Lagerung der Zellen in einem Medium ohne 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Additiv (= Negativ-Kontrolle) wird die RNA wie oben für die Positiv-Kontrolle beschrieben isoliert.

Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 1,0 %-ige Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gele angefertigt. Es werden jeweils 20 µl des Eluates eingesetzt. Das Ergebnis ist in Fig. 13 wiedergegeben. Spur 1 enthält Gesamt-RNA, die nach Lagerung der

Zellen in Medium gemischt mit 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Weinsäure, pH 5 isoliert wird. Spur 2 zeigt Gesamt-RNA, die nach Lagerung der Zellen in Medium gemischt mit 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Ammoniumphosphat, bei pH 5 isoliert wird. Die Spur 3 zeigt eine Gesamt-RNA, die nach Lagerung der Zellen nur in Medium isoliert wird und die Spur 4 zeigt eine Gesamt-RNA, die als Positiv-Kontrolle ohne vorherige Lagerung isoliert wird.

Die Menge an isolierter Gesamt-RNA wird nach Verdünnung in Wasser durch photometrische Messung der Lichtabsorption bei einer Wellenlänge von 260 nm ermittelt. Die Reinheit der so gewonnenen RNA wird durch die photometrische Bestimmung des Verhältnisses der Lichtabsorption bei 260 nm zu derjenigen bei 280 nm bestimmt. Die Ergebnisse der Isolierungen sind in der nachfolgenden Tabelle 11 dargestellt.

Tabelle 11: RNA-Ausbeute der nach Beispiel 13 aus adhärenten Hela-Zellen isolierten Gesamt-RNA.

Lagerung in Medium gemischt mit	RNA-Ausbeute (µg)	$E_{260}/E_{280}$
4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Weinsäure, pH 5	10,9	1,70
4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Ammoniumsulfat, pH 5	13,2	1,75
-	6,1	1,58
Positiv-Kontrolle ohne Lagerung	12,5	1,75

Die geelektrophoretische Auftrennung zeigt nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die intakte 28S und 18S rRNA-Banden in der nicht gelagerten Probe ebenso wie in den mit Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat-Additiv-Mischungen gelagerten Proben. Dagegen ist die RNA in den Zellen, die in Medium ohne Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat-Additiv-Zugabe gelagert werden, nahezu vollständig abgebaut. Ebenso besteht kein Unterschied zwischen nicht-gelagerten und stabilisierten Proben bezüglich der mittels OD-Messung bestimmten RNA-Ausbeute und -Reinheit, während die Ausbeute und Reinheit der RNA in den in

Medium ohne Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat-Additiv-Zugabe gelagerten Proben deutlich reduziert ist.

Beispiel 14:

**RNA-Stabilisierung in Gewebe mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven**

Diese Experimente zeigen, dass Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven auch geeignet ist RNA aus Gewebe zu stabilisieren.

Zur Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Lösungen wird eine Stammlösung von 20% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit jeweils einer Stammlösung von 0,5 M von Weinsäure, Zitronensäure, Tartronsäure, Ammoniumsulfat, Kaliumphosphat, Oxalsäure oder Phosphorsäure zu einer Endkonzentration von 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM des Additivs vermischt. Die Stammlösungen der Additive werden vor der Mischung mit Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mittels Natronlauge oder Schwefelsäure (oder Ammoniumsulfat) oder Kalilauge bzw. Phosphorsäure (oder Kaliumphosphat) auf den jeweils angegebenen pH-Wert eingestellt.

Nierengewebe der Maus, welches nach Entnahme unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert wurde, wird für diese Experimente verwendet. Je ca. 70 bis 90 mg des Gewebes werden gefroren mit 500 µl je 10 mg Gewebe der in Tabelle 12 genannten Puffer versetzt und sofort mittels eines Rotor-Stator-Homogenisators - wie z. B. des Polytrons der Firma Kinematica - für 30 bis 60 s homogenisiert. Von diesen Homogenisaten werden Aliquots von je 500 µl Lösung abgenommen, die somit 10 mg Gewebe entsprechen. Die Proben werden für einen Tag bei RT gelagert.

Im Anschluß an die Lagerung werden die Proben für 3 min bei 10000 xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird in 600 µl eines handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-Puffers - wie z. B. RLT-Puffer der

50

Firma QIAGEN - durch Vortexen vollständig gelöst. Anschließend wird 1 Volumen (600 µl) 70 %-iges Ethanol zugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s gemischt. Das Lysat wird anschließend in eine handelsübliche Silicamembran enthaltene spin-Säule - wie z. B. RNeasy-Säulen der Firma QIAGEN - aufgetragen und durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran hindurchgeführt. Die RNA bleibt an der Membran gebunden und wird anschließend mit einem ersten handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Waschpuffer, - beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Firma QIAGEN - und danach mit einem zweiten alkoholhaltigen Waschpuffer - z. B. dem Puffer RPE der Firma QIAGEN - gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran hindurchgeführt. Die Waschung mit dem zweiten alkoholhaltigen Waschpuffer wird mit einem geringeren Volumen wiederholt wobei gleichzeitig die Membran durch die Zentrifugation (2 min max. rpm, hier 20000xg) getrocknet wird. Zur Elution werden 40 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, um die gereinigte RNA von der Membran abzulösen. Durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) wird das Eluat durch die Membran hindurchgeführt und der Elutionsschritt wird zum Zwecke einer vollständigen Elution noch einmal wiederholt.

Die isolierte RNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 1,0 %-ige Formaldehyd-Agarose-MOPS-Gele angefertigt. Es werden jeweils 20 µl des Eluates eingesetzt. Das Ergebnis ist in Fig. 14 wiedergegeben. Die Proben sind in Tabelle 12 zusammengefaßt, wobei alle Proben jeweils 2x durchgeführt und dargestellt worden sind.

Tabelle 12: Zusammenfassung der in Fig. 14 dargestellten Proben

Proben Nr	Additiv	pH-Wert des Additivs	finaler pH-Wert der Mischung aus Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und Additiv
1	Weinsäure	3	3,4
2	Weinsäure	4	4,3

3	Weinsäure	51	
4	Weinsäure	6	6,0
5	Weinsäure	7	7,3
6	Zitronensäure	3	3,3
7	Zitronensäure	4	4,3
8	Zitronensäure	5	5,4
9	Zitronensäure	6	6,3
10	Zitronensäure	7	7,5
11	Oxalsäure	4	4,3
12	Oxalsäure	5	5,3
13	Oxalsäure	6,17	6,5
14	Oxalsäure	7	7,2
15	Phosphorsäure	3	4,3
16	Phosphorsäure	4	4,9
17	Phosphorsäure	5	6,0
18	Phosphorsäure	6	6,3
19	Phosphorsäure	7	7,1
20	Kaliumphosphat	4,2	4,9
21	Kaliumphosphat	5	5,3
22	Kaliumphosphat	6	6,1
23	Kaliumphosphat	7	6,9
24	Kaliumphosphat	8	7,8
25	Tartronsäure	3	3,6
26	Tartronsäure	4	4,4
27	Tartronsäure	5	5,3
28	Tartronsäure	6	5,9
29	Tartronsäure	7	7,3
30	Ammoniumsulfat	2	4,1
31	Ammoniumsulfat	3	5,2
32	Ammoniumsulfat	4	6,0
33	Ammoniumsulfat	5	6,1

Die Proben "K" zeigen eine Gesamt-RNA, die ohne vorherige Lagerung mit Hilfe eines Isolierungskits (RNeasy der Fa. Qiagen GmbH) aus 10 mg gefrorenem Nierengewebe isoliert wird (= Positiv-Kontrolle). Die Spuren "N" zeigen eine Gesamt-RNA, die nach eintägiger Lagerung von 10 mg Nierengewebe trocken, d. h. ohne Lösungszugabe mit Hilfe des RNeasy® Mini Kits der Firma QIAGEN isoliert wird (= Negativ-Kontrolle.)

Die gelelektrophoretische Auftrennung der zeigt nach Anfärbung mit Ethidiumbromid die intakte 28S und 18S rRNA-Banden in der Positiv-Kontrolle. Die Negativ-Kontrolle, ohne Stabilisierungslösung gelagertes Nierengewebe, zeigt vollständig abgebaute RNA. Im Gegensatz dazu sind nach Lagerung der Proben in Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven wie in der Positiv-Kontrolle die intakten rRNA-Banden sichtbar. Die Stabilisierung wird dabei vom pH-Wert beeinflußt. Bei der RNA-Stabilisierung in Gewebe werden finale pH-Werte der Stabilisierungslösung nach Mischung von Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und Additiv definierten pH-Wertes von größer 4 bevorzugt.

Beispiel 15:**DNA-Stabilisierung und -Isolierung parallel zur RNA-Stabilisierung und -Isolierung**

Diese Experimente zeigen, dass mittels Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat gemischt mit verschiedenen Additiven neben RNA auch DNA in Gewebe stabilisiert wird. Aus einer Probe kann dabei neben der RNA auch die DNA parallel isoliert werden.

Zur Herstellung der in diesem Experiment verwendeten Lösungen wird eine Stammlösung von 20% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit einer Stammlösung von 0,5 M von Zitronensäure pH 5, eingesetzt mit Natronlauge, zu einer Endkonzentration von 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat und 200 mM des Additivs vermischt.

Nierengewebe der Maus, welches nach Entnahme unverzüglich in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -70°C gelagert wurde, wird für diese Experimente verwendet. Ca. 80 mg des Gewebes werden gefroren mit 4,2 ml 4% Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat, 200 mM Zitronensäure pH 5 versetzt und sofort mittels eines Rotor-Stator-Homogenisators wie z. B. des Polytrons der Firma Kinematica für 30 bis 60 sek. homogenisiert. Von diesem Homogenisat werden Aliquots von je 500 µl Lösung abgenommen, die somit 10 mg Gewebe entsprechen. Die Proben werden für einen Tag bei RT gelagert.

Im Anschluß an die Lagerung werden die Proben für 3 min bei 10000 xg zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wird in 600 µl eines handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-Puffers - wie z. B. RLT-Puffer der Firma QIAGEN - durch Vortexen vollständig gelöst. Anschließend wird 1 Volumen (600 µl) 70 %-iges Ethanol zugefügt und durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren oder durch Vortexen über einen Zeitraum von ca. 5 s gemischt. Das Lysat wird anschließend in eine handelsübliche Silicamembran enthaltene spin-Säule - wie z. B. RNeasy-Säulen der Firma QIAGEN - aufgetragen und durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran hindurchgeführt. Die RNA bleibt an der Membran gebunden und kann anschließend wie in Beispiel 14 beschrieben isoliert

werden. Der Durchfluß (ca. 1200 µl) wird aufgefangen und mit 200 µl 100% Ethanol versetzt und durch Vortexen gemischt. Diese Proben werden erneut in eine handelsübliche Silicamembran enthaltene spin-Säule - wie z. B. QIAamp-Säulen der Firma QIAGEN - aufgetragen und durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran hindurchgeführt. Die DNA bleibt an der Membran gebunden und wird anschließend mit einem ersten handelsüblichen Guanidinium-Isothiocyanat-haltigen Waschpuffer - beispielsweise mit dem Puffer RW1 der Firma QIAGEN - und danach mit einem zweiten alkoholhaltigen Waschpuffer - z. B. Puffer RPE der Firma QIAGEN - gewaschen. Dabei werden die Waschpuffer jeweils durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) durch die Membran geführt. Die Waschung mit dem zweiten alkoholhaltigen Waschpuffer wird mit einem geringeren Volumen wiederholt wobei gleichzeitig die Membran durch die Zentrifugation (2 min max. rpm, hier 20000xg) getrocknet wird. Zur Elution werden 200 µl Wasser auf die Membran pipettiert und 1 min bei RT inkubiert, um die gereinigte DNA von der Membran abzulösen. Durch Zentrifugation (1 min bei 10000 xg) wird das Eluat durch die Membran hindurchgeführt und der Elutionsschritt wird zum Zwecke einer vollständigen Elution noch einmal wiederholt.

Die isolierte DNA wird auf Agarosegelen, die mit Ethidiumbromid angefärbt sind, analysiert. Hierzu werden beispielsweise 0,8 %-ige Agarose-TBE-Gele angefertigt. Es werden jeweils 40 µl der Proben 1 bis 4 und 20 µl der Proben 5 bis 9 eingesetzt. Das Ergebnis ist in Fig. 15 wiedergegeben.

Die Spuren 1 und 2 zeigen die entsprechend Beispiel 15 isolierte Gesamt-DNA. Die Spuren 3 und 4 zeigen 0,1 µg bzw. 0,5 µg einer Gesamt-DNA als Referenz, zur Demonstration des Laufverhaltens einer intakten genomischen DNA im verwendeten Agarosegel. Die Spur 5 zeigt eine Gesamt-DNA, die ohne vorherige Lagerung mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen Isolierungskits (QIAamp® Mini Kits der Firma QIAGEN GmbH) aus 10 mg gefrorenem Nierengewebe der Ratte isoliert wird (= Positiv-Kontrolle). Als Negativ-Kontrolle diente Gesamt-DNA, die nach eintägiger Lagerung von 10 mg Nierengewebe trocken, d. h. ohne Lösungszugabe, oder in A. dest, mit Hilfe des QIAamp® Mini Kits der Firma QIAGEN isoliert wird. Diese DNA ist in den Spuren 6 und 7 (Lagerung trocken) und in den Spuren 8 und 9 (Lagerung in A. dest.) gezeigt.

Die gelektrophoretische Auftrennung zeigt hochmolekulare, nicht degradierte DNA sowohl in den Spuren, welche die Referenz-DNA zeigen als auch in den Spuren, die die DNA der nicht-gelagerten Positiv-Kontrolle enthalten. Die Lagerung des Gewebes trocken oder in Wasser führt zu einem vollständigen Abbau der DNA. Dagegen bleibt aus den entsprechend Beispiel 15 behandelten Proben intakt und wird während der Lagerung nicht gegradiert. Mischungen aus Tetradecyltrimethylammonium-Oxalat mit Additiven sind somit geeignet auch DNA in biologischen Proben zu stabilisieren und erlauben zudem eine parallele Isolierung von RNA und DNA aus einer Probe.

Patentansprüche

1. Komposition umfassend als Bestandteile eine kationische Verbindung der allgemeinen Formel

$$Y^+ R_1 R_2 R_3 R_4 X^-$$

worin

Y Stickstoff oder Phosphor

R<sub>1</sub>, R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> unabhängig voneinander einen unverzweigten oder verzweigten C<sub>1</sub>-C<sub>20</sub>-Alkylrest und/oder einen C<sub>6</sub>-C<sub>20</sub>-Arylrest sowie einen C<sub>6</sub>-C<sub>26</sub>-Aralkylrest und

X<sup>-</sup> ein Anion einer anorganischen oder organischen, ein- oder mehrbasischen Säure

bedeuten können

und mindestens einen Protonendonator.

2. Komposition nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Y Stickstoff bedeutet.

3. Komposition nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet R<sub>1</sub> einen höheren Alkylrest mit vorzugsweise 12, 14 oder 16 Kohlenstoffatomen und R<sub>2</sub>, R<sub>3</sub> und R<sub>4</sub> jeweils eine Methylgruppe bedeutet.

4. Komposition nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass, das Anion X<sup>-</sup> aus der Gruppe der Anionen von Halogenwasserstoffsäuren oder Anionen ein- oder zweibasischer organischer Säuren ausgewählt wird.

5. Komposition nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Anion X<sup>-</sup> Anionen aus der Gruppe Bromid, Chlorid, Phosphat, Sulfat, Formiat, Acetat, Propionat, Oxalat, Malonat, Succinat oder Citrat. ausgewählt wird.
6. Komposition nach einem der Ansprüche 1 bis 5 dadurch gekennzeichnet, dass der Protonendonor aus der Gruppe der gesättigten aliphatischen Monocarbonsäuren, der ungesättigten Alkenyl-carbonsäuren, der gesättigte und/oder ungesättigten aliphatische C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Dicarbonsäuren, der aliphatischen Ketodicarbonsäuren, der Aminosäuren oder aus der Gruppe der Mineralsäuren oder deren Salze allein oder in Kombination ausgewählt wird.
7. Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als aliphatische Monocarbonsäure eine C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>-Alkyl-carbonsäure, vorzugsweise Essigsäure, Propionsäure, n-Buttersäure, n-Valeriansäure, Isovaleriansäure, Ethyl-methyl-essigsäure (2-Methyl-buttersäure), 2,2-Dimethylpropionsäure (Pivalinsäure), n-Hexansäure, n-Octansäure, n-Decansäure bzw. n-Dodecansäure (Laurinsäure) oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
8. Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als aliphatische Alkenyl-carbonsäure Acrylsäure (Propensäure), Methacrylsäure, Crotonsäure, iso-Crotonsäure oder Vinylsäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
9. Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet als gesättigte aliphatische C<sub>2</sub>-C<sub>6</sub>-Dicarbonsäure eine Dicarbonsäure aus der Gruppe Oxalsäure, Malonsäure, Bersteinsäure, Glutarsäure bzw. Adipinsäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
10. Komposition nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass als Protonendonoren aliphatische Dicarbonsäuren, vorzugsweise Oxalsäure oder Bersteinsäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
11. Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Protonendonoren aliphatische Hydroxi-di- und -tricarbonsäuren, vorzugsweise

Tartronsäure, D-(+)-, L-(-)- oder DL-Äpfelsäure, (2R, 3R)-(+)-Weinsäure, (2S, 3S)-(-)-Weinsäure, meso-Weinsäure und Citronensäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.

12. Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Protonendonoren ungesättigte Dicarbonsäuren, vorzugsweise Malein- und/oder Fumarsäure oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
13. Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Protonendonoren ungesättigte Tricarbonsäuren, vorzugsweise Aconitsäure, oder Mischungen dieser Säuren eingesetzt werden.
14. Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Protonendonoren aliphatische Ketodicarbonsäuren, vorzugsweise Mesoxalsäure oder Oxalessigsäure, oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
15. Komposition nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass als Protonendonoren Aminosäuren, vorzugsweise Aminoessigsäure (Glycin),  $\alpha$ -Aminopropionsäure (Alanin),  $\alpha$ -Amino-*iso*-valeriansäure (Valin),  $\alpha$ -Amino-*iso*-capronsäure (Leucin) und  $\alpha$ -Amino- $\beta$ -methylvaleriansäure (Isoleucin), oder Mischungen der genannten Säuren eingesetzt werden.
16. Komposition nach einem der Ansprüche 1 bis 15, dadurch gekennzeichnet, dass sie in wässriger Lösung vorliegt.
17. Komposition nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die kationische Verbindung in einer Konzentration in einem Intervall von 0.01 Gew.-% bis zur Sättigung, bevorzugt zwischen 0.1 Gew.-% und der Sättigung, besonders bevorzugt zwischen 0.5 und 15 Gew.-% und ganz besonders bevorzugt zwischen 2 und 10 Gew.-% liegt.
18. Verfahren zur Herstellung einer der Kompositionen nach einem der Ansprüche 1 bis 17, dadurch gekennzeichnet, dass man die einzelnen Bestandteile gegebenenfalls in wässriger Lösung zusammenfügt und vermischt.

19. Verwendung einer Komposition gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17 zur Isolierung und/oder Stabilisierung von Nukleinsäuren.
20. Verwendung gemäß Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, dass als Nukleinsäuren Ribonukleinsäuren (RNA), Desoxyribonukleinsäuren (DNA) stabilisiert werden.
21. Verwendung gemäß Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, dass Nukleinsäuren Ribonukleinsäuren (RNA) oder Desoxyribonukleinsäuren (DNA) in Form von monomeren Nukleotiden, Oligomeren, Plasmide, in Form viraler und/oder bakterieller DNA und RNA, sowie genomische und nichtgenomische DNA und RNA aus Tier- und Pflanzenzellen oder anderen Eukaryonten stabilisiert werden.
22. Verwendung gemäß Anspruch 21, dadurch gekennzeichnet, dass als Nukleinsäuren mRNA in prozessierter und unprozessierter Form, tRNA, mRNA, rRNA, cDNA stabilisiert werden.
23. Diagnostische Zusammensetzung, enthaltend eine Komposition gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17.
24. Kit zur Stabilisierung von Nukleinsäuren enthaltend eine Komposition gemäß einem der Ansprüche 1 bis 17.
25. Mischung enthaltend eine Nukleinsäure-haltige biologische Probe und eine Komposition nach einem der Ansprüche 1 bis 17 gegebenenfalls neben weiteren Hilfsstoffen.
26. Mischung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, dass der pH-Wert der Mischung in einem Bereich von 2 bis 12, bevorzugt 2 bis 10 und besonders bevorzugt in einem Intervall von 3 bis 8 liegt.
27. Mischung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Probe, die ggf. Viren oder Bakterien enthalten kann Blut, Plasma oder Serum ist.

28. Mischung nach Anspruch 27, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Mischung in einem Bereich von 2 bis 6, bevorzugt 3 bis 4 liegt.
29. Mischung nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die biologische Probe, die ggf. Viren oder Bakterien enthalten kann, durch ein Punktat, Zellen, Gewebe oder Bakterien verkörpert wird.
30. Mischung nach Anspruch 29, dadurch gekennzeichnet, daß der pH-Wert der Mischung in einem Bereich von 3 bis 10, bevorzugt 4 bis 8 liegt.

1/15

10% TTAOx/  
200 mM Essigsäure pH 3  
48 h RT



10% TTAOx/  
200 mM Bernsteinsäure pH 2  
48 h RT



10% TTAOx/  
200 mM Malonsäure pH 2  
48 h RT



10% TTAOx/  
200 mM Glutarsäure pH 2  
24 h RT



10% TTAOx/  
200 mM Oxalsäure pH 3  
24 h RT



10% TTAOx/  
200 mM Zitronensäure pH 3  
24 h RT



10% TTAOx/  
200 mM Weinsäure pH 3  
48 h RT



10% TTAOx/  
200 mM Äpfelsäure pH 3  
24 h RT



10% TTAOx/  
200 mM Tartronsäure pH 4  
48 h RT



10% TTAOx/  
200 mM Adipinsäure pH 2  
24 h RT



Fig. 1

2/15

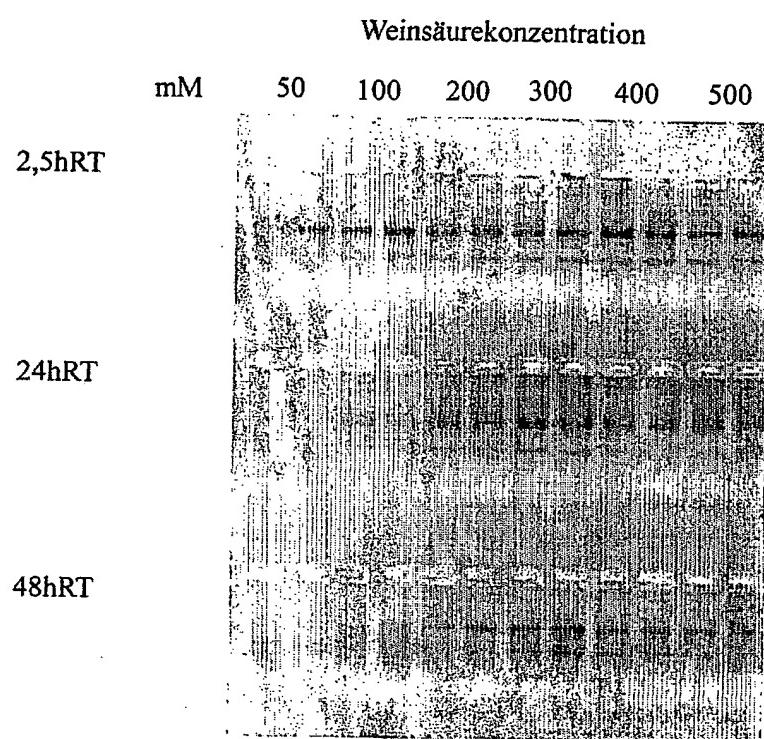
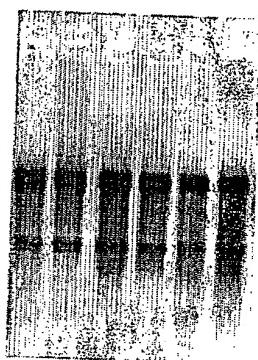


Fig. 2

3/15

24h 48h 72h

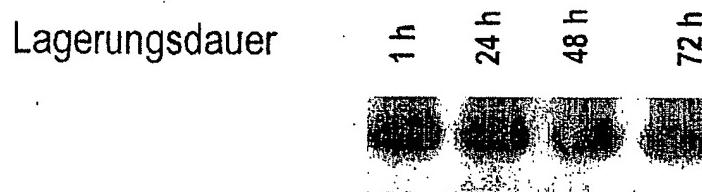


RNA Ausbeute: OD 260/280nm:

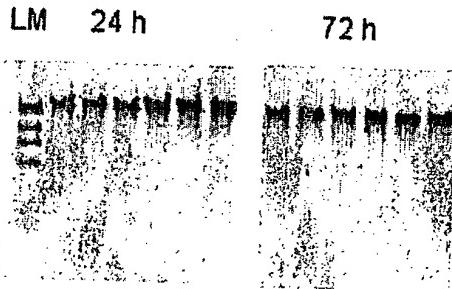
24h	5,1 µg	1,94
	5,5 µg	1,91
48h	6,5 µg	1,95
	6,2 µg	1,92
72h	5,9 µg	1,94
	7,1 µg	1,92

Fig. 3

4/15

**A: GAPDH-Sonde****B: IFN- $\gamma$  Sonde****Fig. 4**

5/15



LM= Längenmarker (800 ng Lambda-DNA geschnitten mit Hind III)

Ausbeute (bestimmt über OD260 nm) :

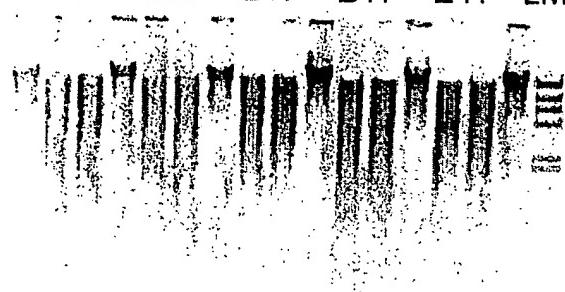
	Durchschnitt	Schwankungsbreite
24h	50 µg	47 - 54 µg
72h	30 µg	26 - 34 µg

Fig. 5

6/15

## A. Enzymatische Restriktion der DNA

EH EH EH EH EH LM



## B. PCR-Amplification der hugl-Gens

obere Reihe: 150 ng DNA/ 50 µl Reaktion  
untere Reihe: 300 ng DNA/ 50 µl Reaktion



Fig. 6

7/15

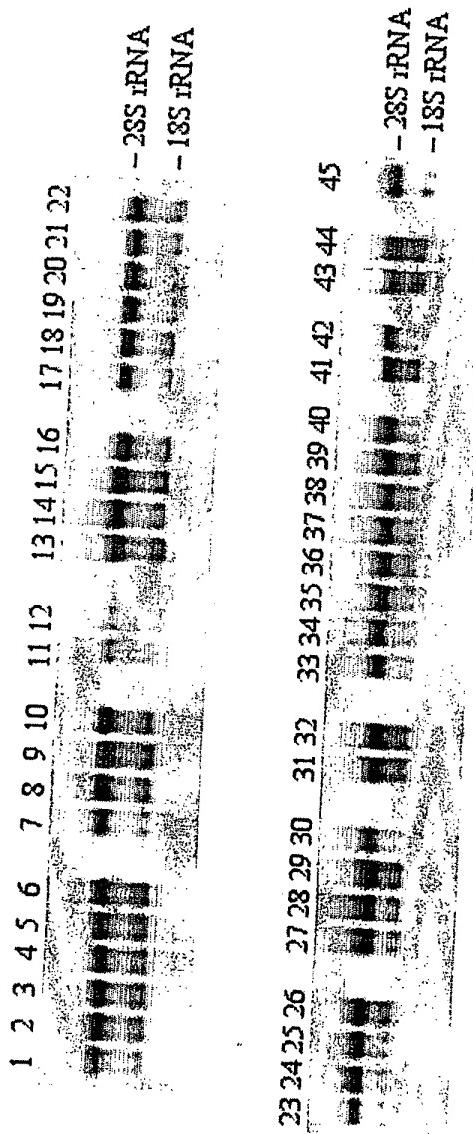


Fig. 7

8/15

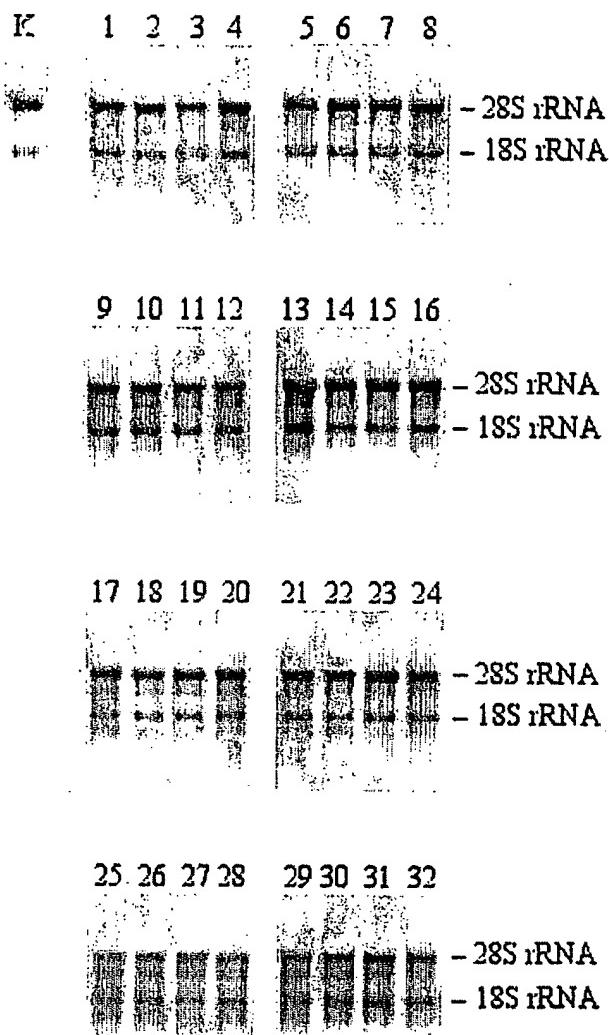


Fig. 8

9/15

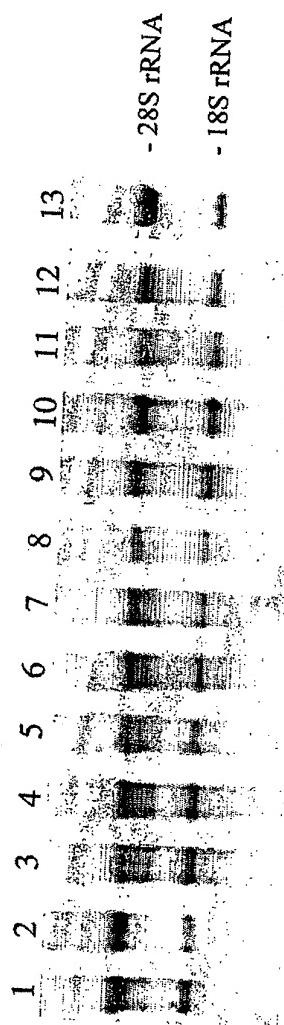


Fig. 9

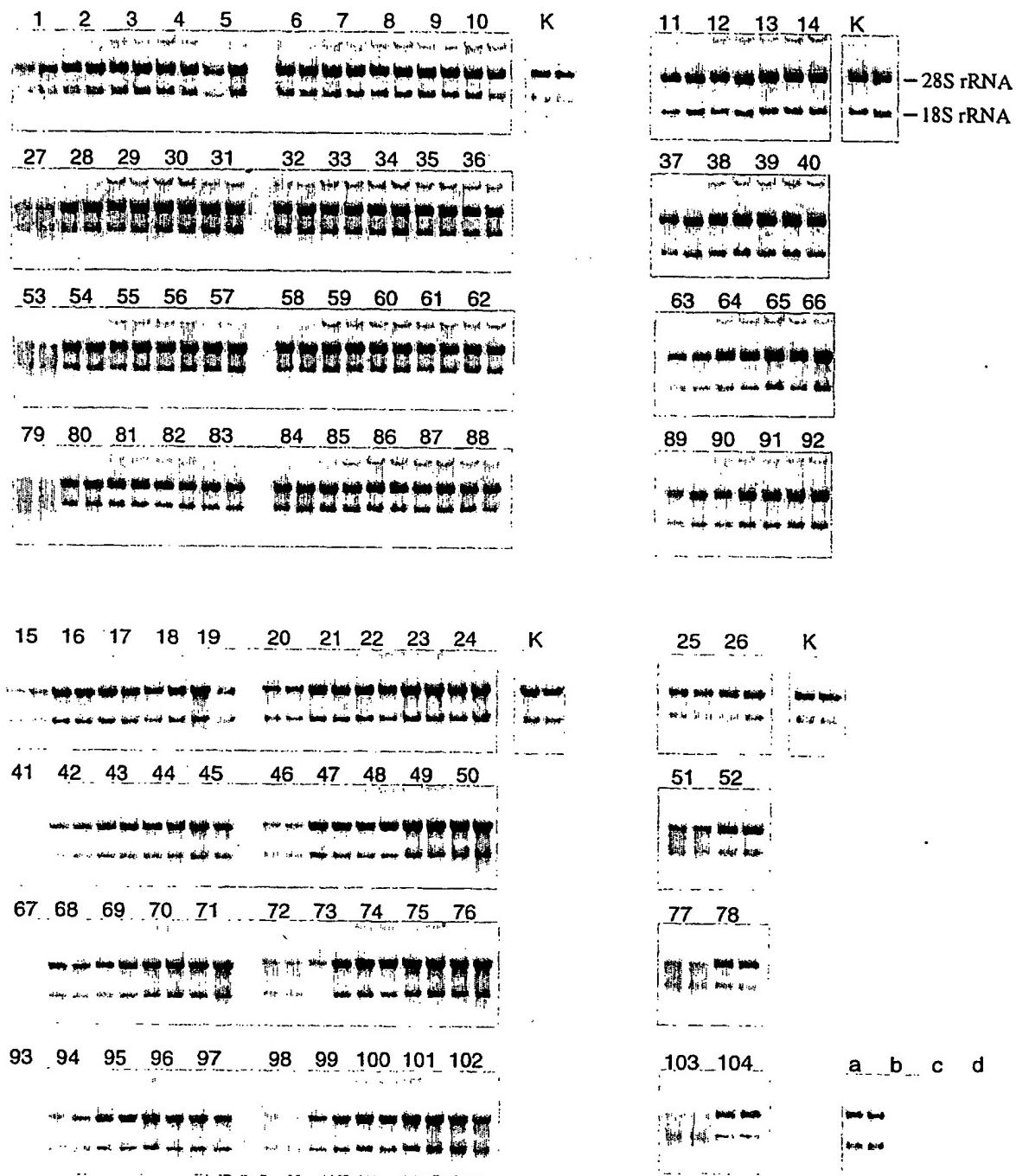


Fig 10

11/15

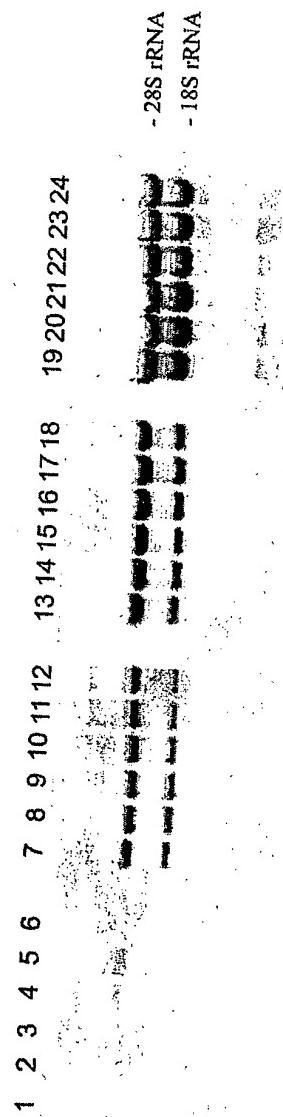


Fig. 11

12/15



Fig. 12

13/15

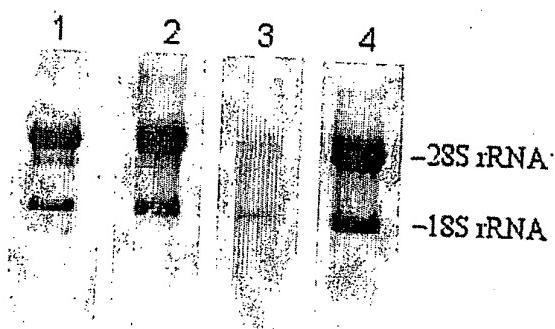


Fig. 13

14/15

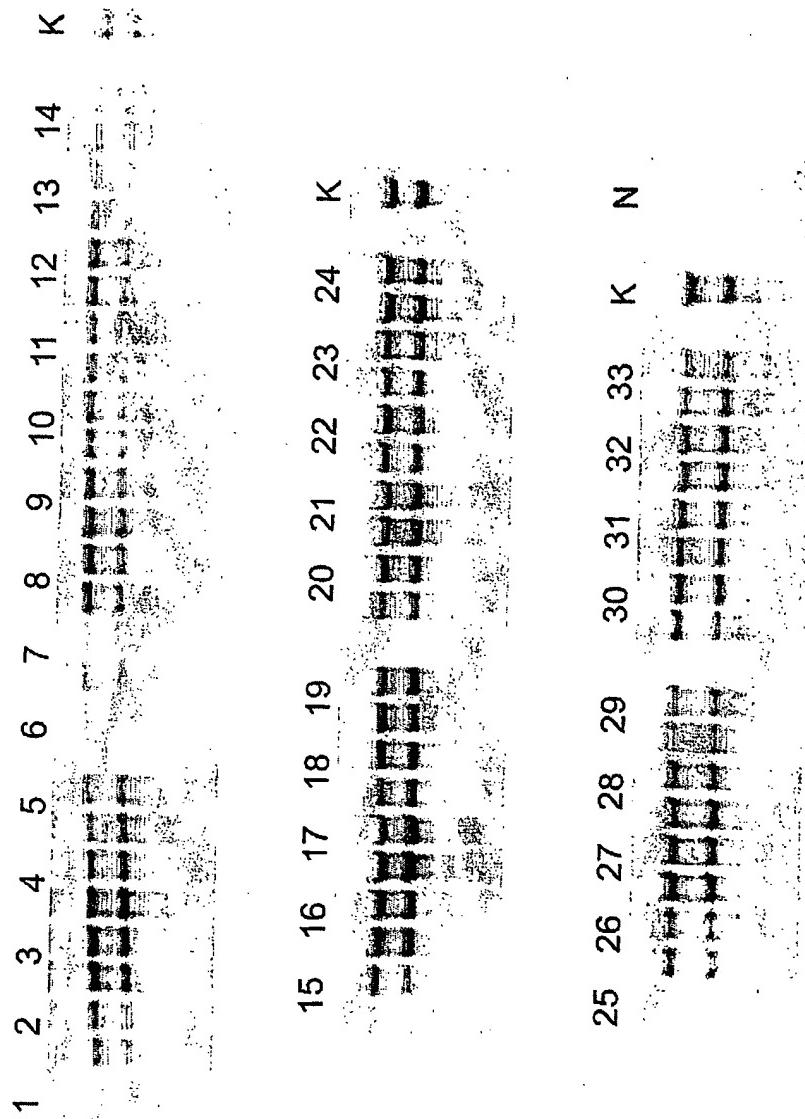


Fig. 14

15/15

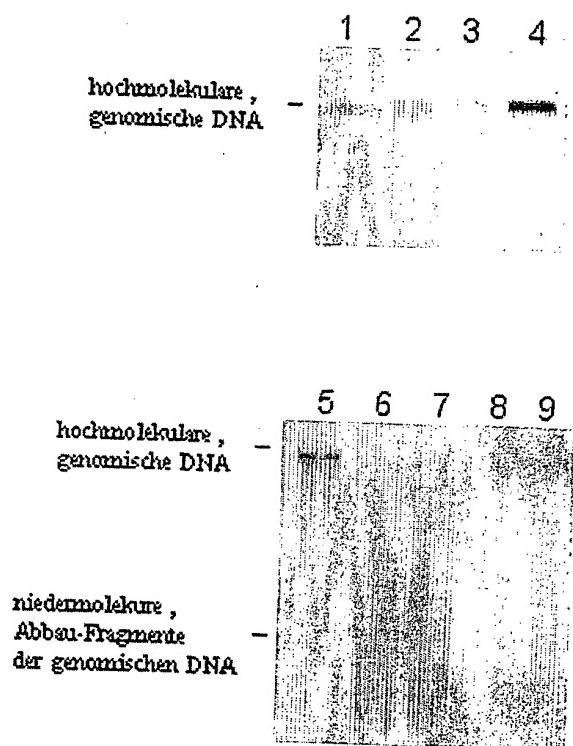


Fig. 15

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No  
01/05888

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C07C211/62 C07C211/63 C07C211/64 C07F9/54 C11D3/00  
C12N15/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C07C C07F C11D C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, BEILSTEIN Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 891 921 A (WALKER LEIGH E) 6 April 1999 (1999-04-06) column 6, line 64 - line 67 column 7, line 26 - line 30 claim 1; examples 162,162B,163,164 ---	1-7, 16-18
X	GB 1 289 426 A (SHELL INT.) 20 September 1972 (1972-09-20) page 2, column 2, line 90 -page 3, column 1, line 18; claim 1 ---	1,3-7
X	US 5 275 708 A (AKINS JR ROBERT E ET AL) 4 January 1994 (1994-01-04) claims 1,2 ---	1-4,6,15
X	EP 0 606 712 A (CLOROX CO) 20 July 1994 (1994-07-20) claims 3,5,6,10; examples 1-3 ---	1-6,11 -/-

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents :

- \*A\* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- \*E\* earlier document but published on or after the International filing date
- \*L\* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- \*O\* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- \*P\* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- \*T\* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- \*X\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- \*Y\* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- \*8\* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

Date of mailing of the International search report

30 October 2001

09/11/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seelmann, M

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Application No

EP 01/05888

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 300 635 A (MACFARLANE DONALD E) 5 April 1994 (1994-04-05) cited in the application column 3, line 44 - line 52; examples 1,5 -----	1-30

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Application No

1/05888

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)	Publication date
US 5891921	A	06-04-1999	US	5641726 A	24-06-1997
			AU	7107694 A	03-01-1995
			CA	2162128 A1	22-12-1994
			EP	1114704 A2	11-07-2001
			EP	1122044 A1	08-08-2001
			EP	1121857 A1	08-08-2001
			EP	0702517 A1	27-03-1996
			IL	109964 A	22-09-1999
			IL	122727 A	12-03-1999
			IL	122729 A	12-03-1999
			IL	122730 A	12-03-1999
			IL	124041 A	31-01-2000
			JP	8511543 T	03-12-1996
			NZ	268249 A	26-08-1998
			NZ	329861 A	29-07-1999
			WO	9428715 A1	22-12-1994
			US	5700841 A	23-12-1997
			US	6087303 A	11-07-2000
			ZA	9403999 A	03-02-1995
GB 1289426	A	20-09-1972	DE	2130679 A1	23-12-1971
			FR	2099266 A5	10-03-1972
US 5275708	A	04-01-1994	NONE		
EP 0606712	A	20-07-1994	BR	9305392 A	02-08-1994
			CA	2107939 A1	14-07-1994
			DE	69308010 D1	20-03-1997
			DE	69308010 T2	22-05-1997
			EP	0606712 A1	20-07-1994
			ES	2096872 T3	16-03-1997
			KR	227630 B1	01-11-1999
			MX	9308044 A1	31-08-1994
			US	5639722 A	17-06-1997
US 5300635	A	05-04-1994	AU	6230594 A	29-08-1994
			JP	8506340 T	09-07-1996
			US	5985572 A	16-11-1999
			WO	9418156 A1	18-08-1994
			US	5728822 A	17-03-1998

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Ir is Aktenzeichen

U/Er 01/05888

**A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES**  
 IPK 7 C07C211/62 C07C211/63 C07C211/64 C07F9/54  
 C12N15/10 C11D3/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

**B. RECHERCHIERTE GEBiete**

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)  
 IPK 7 C07C C07F C11D C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)  
**EPO-Internal, WPI Data, PAJ, BIOSIS, BEILSTEIN Data**

**C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN**

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 5 891 921 A (WALKER LEIGH E) 6. April 1999 (1999-04-06) Spalte 6, Zeile 64 - Zeile 67 Spalte 7, Zeile 26 - Zeile 30 Anspruch 1; Beispiele 162,162B,163,164	1-7, 16-18
X	GB 1 289 426 A (SHELL INT.) 20. September 1972 (1972-09-20) Seite 2, Spalte 2, Zeile 90 -Seite 3, Spalte 1, Zeile 18; Anspruch 1	1, 3-7
X	US 5 275 708 A (AKINS JR ROBERT E ET AL) 4. Januar 1994 (1994-01-04) Ansprüche 1,2	1-4,6,15
X	EP 0 606 712 A (CLOROX CO) 20. Juli 1994 (1994-07-20) Ansprüche 3,5,6,10; Beispiele 1-3	1-6,11
-/-		

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts

30. Oktober 2001

09/11/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde  
 Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlanta 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Seelmann, M

## INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

In  
Fü... es Aktenzeichen  
01/05888

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.:-
A	US 5 300 635 A (MACFARLANE DONALD E) 5. April 1994 (1994-04-05) in der Anmeldung erwähnt Spalte 3, Zeile 44 - Zeile 52; Beispiele 1,5	1-30

**INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen

zur selben Patentfamilie gehören

In nationales Aktenzeichen

PCT/EP 01/05888

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 5891921	A 06-04-1999	US 5641726 A AU 7107694 A CA 2162128 A1 EP 1114704 A2 EP 1122044 A1 EP 1121857 A1 EP 0702517 A1 IL 109964 A IL 122727 A IL 122729 A IL 122730 A IL 124041 A JP 8511543 T NZ 268249 A NZ 329861 A WO 9428715 A1 US 5700841 A US 6087303 A ZA 9403999 A	24-06-1997 03-01-1995 22-12-1994 11-07-2001 08-08-2001 08-08-2001 27-03-1996 22-09-1999 12-03-1999 12-03-1999 12-03-1999 31-01-2000 03-12-1996 26-08-1998 29-07-1999 22-12-1994 23-12-1997 11-07-2000 03-02-1995
GB 1289426	A 20-09-1972	DE 2130679 A1 FR 2099266 A5	23-12-1971 10-03-1972
US 5275708	A 04-01-1994	KEINE	
EP 0606712	A 20-07-1994	BR 9305392 A CA 2107939 A1 DE 69308010 D1 DE 69308010 T2 EP 0606712 A1 ES 2096872 T3 KR 227630 B1 MX 9308044 A1 US 5639722 A	02-08-1994 14-07-1994 20-03-1997 22-05-1997 20-07-1994 16-03-1997 01-11-1999 31-08-1994 17-06-1997
US 5300635	A 05-04-1994	AU 6230594 A JP 8506340 T US 5985572 A WO 9418156 A1 US 5728822 A	29-08-1994 09-07-1996 16-11-1999 18-08-1994 17-03-1998

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**